



Departamento de Bioquímica

CCDC56, una proteína esencial para la formación de la citocromo *c* oxidasa en células humanas

Tesis Doctoral

Paula Clemente Pérez

Madrid 2012

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**CCDC56, una proteína esencial para la formación
de la citocromo *c* oxidasa en células humanas**

Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica
Paula Clemente Pérez
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:
Rafael Garesse Alarcón
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular
Miguel Ángel Fernández Moreno
Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC-UAM

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

Rafael Garesse Alarcón, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Miguel Ángel Fernández Moreno, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad Autónoma de Madrid, como Directores de Tesis,

CERTIFICAN:

Que Doña Paula Clemente Pérez con D.N.I.: 50.883.507-D, licenciada en Bioquímica ha realizado, bajo nuestra dirección, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid / Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, el trabajo titulado:

**CCDC56, una proteína esencial para la formación
de la citocromo *c* oxidasa en células humanas**

Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a 27 de Febrero de 2012.

Rafael Garesse Alarcón
Director de Tesis

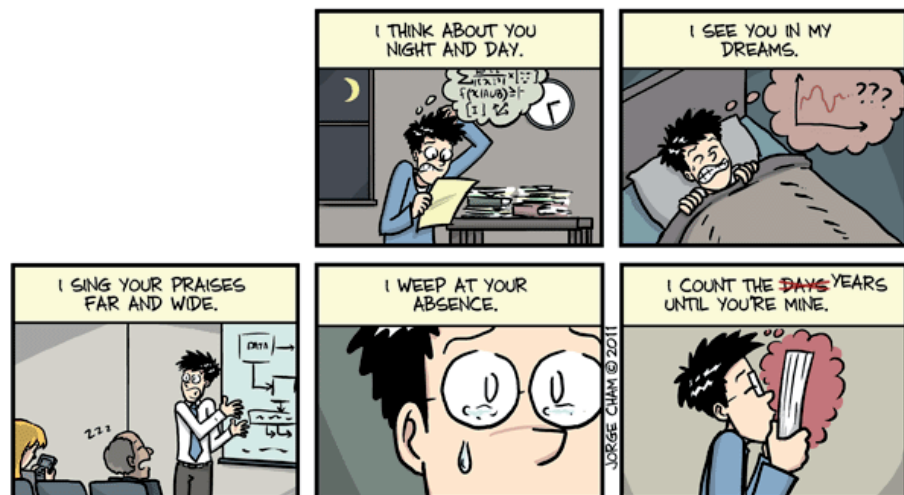
Miguel A. Fernández Moreno
Director de Tesis

Departamento de Bioquímica UAM
C/ Arzobispo Morcillo s/n
28029 Madrid

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de un
Contrato Personal Investigador de Apoyo por parte de la Comunidad de
Madrid a Paula Clemente Pérez

*A mis padres y mi hermana
con todo mi amor*

HOW DO I LOVE YOU, THESIS?
LET ME COUNT THE WAYS...



WWW.PHDCOMICS.COM

AGRADECIMIENTOS

Durante todos estos años de tesis he estado acompañada por mucha gente, que han sido sin duda la parte más importante de este trabajo. Sin ellos nada de lo que aquí presento habría sido posible o por lo menos no habría sido tan entretenido. Y por eso quiero desde aquí expresaros mi más sincero agradecimiento.

No puedo empezar estos agradecimientos por otras personas que no sean mis padres, Marisa y Pedro. Ellos son los principales responsables de que yo haya llegado hasta aquí. Mamá, Papá, gracias por vuestro apoyo, por vuestra paciencia infinita y por darme siempre todo lo que necesito. Por todas las cosas que hacéis por mí cada día. Gracias por haberme hecho como soy, por enseñarme a ser trabajadora y por demostrarme que con esfuerzo y tesón uno puede conseguir lo que se propone. Pero sobre todo gracias por vuestro amor incondicional. Por eso esta tesis es para vosotros.

A continuación les tengo que agradecer a los directores de esta tesis, los profesores Rafael Garesse Alarcón y Miguel Ángel Fernández Moreno, que me dieron hace ya mucho tiempo la oportunidad de trabajar con ellos. Rafa gracias por tu sensatez, tu paciencia y tus siempre buenos consejos, por tranquilizarme y ayudarme siempre que lo he necesitado y por enseñarme a pensar. Gracias por haber confiado en mí desde el primer momento en que me aceptaste como parte de tu laboratorio y principalmente por ser un ejemplo inmejorable como científico y como persona. A tí Miguel gracias por tu infinita paciencia, porque, aunque no me oirás repetirlo otra vez, se que nunca fui una becaria dócil. Gracias por todas las charlas y los consejos, por tu cariño y apoyo. Y gracias por enseñarme a trabajar, a pensar en cada momento lo que tenía en el tubo. Si a alguien le tengo que agradecer mis habilidades técnicas es a tí, no podría haber tenido un mejor maestro en la poyata.

Han sido muchos los años que he pasado en el laboratorio B19 y he tenido la oportunidad de compartíroslos con mucha gente que ha pasado por allí, desde que entré con Pablo, Pilar, Mari Carmen o Cristina hasta los miembros actuales del laboratorio Mercedes, Carmen, Cristina y Milena. Gracias Belen por tu amabilidad, tu alegría y tus ánimos. Rosana, no se me olvidarán los buenos momentos que hemos pasado, gracias por sonreír siempre. Esther, nuestras tardes de risas siempre hacían el trabajo mucho más ameno. Y gracias también a Sara, y especialmente Ramiro y Alberto, las nuevas incorporaciones, que con su simpatía han conseguido que esta etapa de escritura de la Tesis haya sido un poco menos dura.

Mucha gente pasó por el laboratorio en pequeñas estancias, Mari, Berta, Justine y especialmente Maca que hicieron del B19 un sitio mucho más divertido. Gracias Gonzalo, nuestro estudiante estrella, porque hiciste que los veranos fueran simplemente inigualables.

Pero si a alguien le tengo que agradecer su apoyo en esta tesis, su constante ayuda, su comprensión y por encima de todo su cariño y amistad es a Emiliano, Álvaro, Vero y Luci. Ha sido un verdadero placer compartir laboratorio y experiencias con vosotros y sé que vaya donde vaya, nunca voy a tener unos compañeros tan geniales. A Emi, mil gracias por tu ayuda, por tu apoyo que se nota incluso estando lejos y sobre todo por el buen humor que le pones a todo lo que haces. A Alvarito, gracias por tu paciencia, por tu comprensión, por lo bien que sabes escuchar, por aguantarnos a las tres y por hacer que aunque estés en Sheffield no se note la distancia. Verito, se que diga lo que diga las palabras se me quedarán cortas porque no se que habría hecho sin tí. Gracias por ser así de maravillosa, por todos los grandes momentos que hemos pasado juntas, por las risas, por tu ayuda, por todo lo que te implicas en cada cosa que haces. Se que nunca me lo pasaré tan bien trabajando como lo he hecho contigo. Y por último Luci, mi compañera de aventuras durante todos estos años de tesis, no he podido tener una compi mejor. Tengo tanto que agradecerte que necesitaría dos o tres tesis, pero sobre todo gracias por tu amistad, por tu cariño y porque sólo con estar ahí has hecho que esta experiencia mereciera la pena.

También le tengo que dar las gracias a los “vecinos” de nuestro laboratorio por su ayuda y por las sugerencias e ideas en los seminarios que hemos compartido. Gracias a Margarita, Juan, Lucía, Raquel, Mari Cruz, Jorge, Bego, Pedro y Berta. A David por su fiesta en el nidito. Gracias Leti por tu apoyo, tu amistad y por esa alegría tan contagiosa que tienes. A Luisja, nuestro apéndice, porque desde que te fuiste el departamento no ha sido el mismo. Y sobre todo mil gracias a Oihane que, aunque nos encontramos tarde, me ha demostrado ser una amiga increíble siempre preocupada y dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado.

No me puedo olvidar, aunque solo sea por el tiempo que he pasado allí, de agradecerles su amabilidad y su paciencia a las chicas del Servicio de Protección Radiológica. Gracias a M^a Teresa, Raquel y sobre todo a Sonia y Ángela porque sin ellas seguro que los marcajes no habrían sido tan agradables.

Continuando con los agradecimientos científicos, quiero agradecerle al Dr. Antoni Barrientos de la Universidad de Miami el haberme acogido unos meses en su laboratorio. *Thanks to Jingjing, Alex, Ileana, Darryl and specially Toni and Flavia for their ideas and suggestions, for treating me so wonderfully well the time I spent in their lab and for teaching me to fight every experiment. Thanks very much.* Y por último quiero agradecerle a la Dra. Cristina Ugalde el haberme enseñado la maravillosa técnica del Blue Native que tantas y tantas veces he repetido a lo largo de la tesis.

Dejando de lado a los científicos tengo que agradecerle a mi familia que está siempre conmigo. Por encima de todos, a mis tíos Virginia y Pablo y a mis primas María e Irene, por vuestro cariño y por preocuparos por mí y a Ire además por la compañía tan estupenda que me ha hecho los muchos domingos que me ha acompañado al laboratorio.

To my loving Irish family, who always treats me like one of their own, for teaching me the English I know.

A todos mis amigos de la carrera por estar siempre conmigo durante la facultad y después de ella. A Javi, Kike, Loli y especialmente a Larita por haberme seguido tan de cerca durante esta Tesis. A mis amigas de Biología, mis amiguitas ocupadas, Chiqui, Patty, Sara, Laura y Elvi, y las que no son de Biología, Merry y Ana, gracias por todos los desahogos mientras nos tomamos unas cañas. A Manu, por todos los buenos ratos que hemos pasado y por lo que nos has ayudado en todo lo que hacemos fuera de la ciencia. A mis amigas del cole Soti y Con y también a Edu, por vuestro cariño, por todos estos años de amistad y por los buenos momentos que hemos pasado juntas. Y a Ro por todos estos años de amistad en los que siempre ha estado pendiente de mis progresos.

A los mejores anfitriones del mundo, María la Peque y Daniel, por todas las escapadas a Alemania. Peque, cada día de estos 29 años que llevamos juntas me has demostrado que eres la mejor amiga que se puede tener. Gracias Daniel por hacer que esta Tesis esté mucho más mona. No me podía imaginar a nadie mejor para formar la familia Swoboda-Peña.

A Javi por estar siempre conmigo desde que el día que nos conocimos, por ayudarme y darme tranquilidad, por alegrarme cada día. Por los desayunos y las meriendas. Por quererme y querer acompañarme en todo lo que tenemos por delante. No podría tener un mejor compañero de viaje.

Y por último a Marta, mi gordi. Sister, son tantas las cosas que tengo que agradecerte que no acabaría nunca, pero lo resumiré en darte las gracias por tu amor incondicional de hermana, por estar conmigo en todo lo que hago, cuando nos queremos y cuando nos peleamos, en definitiva por hacer que todo en la vida sea mucho más divertido. *I love you to pieces, to you I dedicate this Thesis.*

RESUMEN / SUMMARY

La principal función de la mitocondria es la producción de energía química en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa, un proceso llevado a cabo por los cinco complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. El complejo IV o citocromo *c* oxidasa es el complejo final de la cadena respiratoria, el cual cataliza la oxidación del citocromo *c* transfiriendo sus electrones al oxígeno. De las trece subunidades que componen el complejo IV en humanos, tres de ellas, COX1, COX2 y COX3, están codificadas en el genoma mitocondrial y las 10 restantes, COX4, COX5a, COX5b, COX6a, COX6b, COX6c, COX7a, COX7b, COX7c y COX8, se encuentran codificadas en el ADN nuclear. El proceso de ensamblaje de estas subunidades para formar el holoenzima maduro requiere la participación de un gran número de proteínas accesorias conocidas como factores de ensamblaje.

El estudio del factor de traducción mitocondrial mtTFB1 de *Drosophila melanogaster* nos ha permitido identificar a CCDC56 (*“Coiled-coil domain containing 56”*), una proteína de función desconocida codificada en lo que se consideraba la región 5' no traducida del mensajero y que se encuentra conservada desde *Drosophila* hasta humanos.

El gen *CCDC56* humano codifica una pequeña proteína integral de la membrana mitocondrial de 11.7 KDa. Su caracterización funcional mediante interferencia de ARN nos ha permitido concluir que CCDC56 es una proteína esencial para la formación de la citocromo *c* oxidasa en células humanas. El silenciamiento de *CCDC56* provoca un déficit aislado de la actividad del complejo IV acompañado de una disminución de la cantidad de complejo totalmente ensamblado. El análisis de los intermediarios de ensamblaje del complejo IV en las células con el déficit de CCDC56 mostró que el ensamblaje del mismo se encontraba bloqueado, lo que provocaba una rápida degradación de las subunidades que lo componen. Este bloqueo en el ensamblaje va acompañado de una disminución de la síntesis de COX1, lo que apunta a que CCDC56 está implicada en la coordinación de la traducción de COX1 con el ensamblaje del complejo IV.

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de enfermedades poco frecuentes que pueden estar causadas por mutaciones en cualquiera de los genes que afectan al funcionamiento del sistema OXPHOS, haciendo de *CCDC56* un excelente candidato para analizar en pacientes cuya enfermedad curse con un defecto del complejo IV.





Mitochondria generate most of the cell's energy supply in the form of ATP in a process known as oxidative phosphorylation. This process is carried out by the five complexes of the respiratory chain. Complex IV or cytochrome *c* oxidase is the terminal enzyme of the respiratory chain and catalyzes the oxidation of cytochrome *c* transferring its electrons to molecular oxygen. Human complex IV is composed of 13 subunits, three of which, COX1, COX2 and COX3, are encoded on the mitochondrial genome, while the remaining ten subunits, COX4, COX5a, COX5b, COX6a, COX6b, COX6c, COX7a, COX7b, COX7c and COX8, are encoded on nuclear DNA. The assembly process of these subunits to form the mature holoenzyme requires the participation of a great number of accessory proteins known as assembly factors.


The study of *Drosophila melanogaster* mitochondrial translation factor mtTFB1 has led us to the identification of CCDC56 (Coiled-coil domain containing 56), a protein of unknown function encoded on what was considered to be the 5' untranslated region of the mRNA. This novel protein is conserved from *Drosophila* to humans.

Human *CCDC56* codes for a small (11.7 KDa) transmembrane protein that localizes to the mitochondria. Its functional characterization using RNA interference has allowed us to conclude that CCDC56 is an essential protein for cytochrome *c* oxidase biogenesis in human cell lines. *CCDC56* knockdown causes an isolated deficit of complex IV activity and a decrease in the amount of fully assembled complex. Analysis of complex IV assembly intermediates in these cells showed the assembly of the complex was impaired, causing a rapid degradation of its subunits. Together with the block in COX assembly, CCDC56 knockdown causes a decrease in the synthesis of COX1, suggesting CCDC56 is involved in the coordination of COX1 synthesis and complex IV assembly.

Mitochondrial pathologies are a rare group of heterogeneous diseases which can be caused by genetic defects in any of the genes involved in the proper function of the OXPHOS system. CCDC56 involvement in COX biogenesis makes it an excellent candidate to analyze in patients suffering diseases caused by complex IV defects.

ÍNDICE

 ABREVIATURAS	31
 INTRODUCCIÓN	35
1. La mitocondria	37
1.1. Origen y evolución de la mitocondria	37
1.2. Estructura, morfología y distribución de las mitocondrias	38
1.3. Función mitocondrial	39
2. Estructura y metabolismo del genoma mitocondrial	41
2.1. Estructura y herencia del ADN mitocondrial	41
2.2. Replicación del ADN mitocondrial	43
Maquinaria basal de replicación del ADN mitocondrial	43
2.3. Transcripción del ADN mitocondrial	44
2.4. Traducción mitocondrial	45
Regulación de la traducción mitocondrial	45
3. Biogénesis de los complejos de la cadena respiratoria	47
3.1. Inserción de las proteínas en la membrana mitocondrial interna	47
3.2. Ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria	48
3.3. Biogénesis de la citocromo <i>c</i> oxidasa	48
Estructura de la citocromo <i>c</i> oxidasa	48
Ensamblaje de la citocromo <i>c</i> oxidasa	49
4. Patología mitocondrial	53
5. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo para el estudio de la fisiopatología mitocondrial	54
5.1. Identificación de nuevos genes mitocondriales en <i>Drosophila melanogaster</i>	55
 OBJETIVOS	57
 MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. Materiales	63
1.1. Reactivos, soluciones y tampones	63
1.2. Radioisótopos	63
1.3. Líneas celulares	63
1.4. Cepas bacterianas	63
1.5. Vectores	64
1.6. Oligonucleótidos	64
Oligonucleótidos para el clonaje de <i>CCDC56</i> en pRSET B	64
Oligonucleótidos para el clonaje de <i>CCDC56</i> en pIRESpuro2	64
Oligonucleótidos para PCR cuantitativa de los ARNm mitocondriales	64

Oligonucleótidos para la secuenciación de <i>CCDC56</i> en pacientes con déficit del complejo IV	65
1.7. siRNAs y sondas Taqman	65
1.8. Anticuerpos	66
2. Métodos	66
2.1. Clonajes	67
2.2. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis de secuencias	67
2.3. Aislamiento de ácidos nucleicos	67
Aislamiento de ARN de células en cultivo	67
Aislamiento de ADN plasmídico	67
2.4. RT-PCR y PCR cuantitativa (qPCR)	68
2.5. Cultivo de líneas celulares y transfección	68
2.6. Curvas de crecimiento	68
2.7. Inmunocitoquímica	68
2.8. Aislamiento de proteínas totales de células en cultivo	69
2.9. Purificación de mitocondrias	69
2.10. Fraccionamiento submitocondrial	69
2.11. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western Blot)	69
2.12. Determinación de actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	70
2.13. Medida de la actividad citrato sintasa	70
2.14. Marcaje <i>in vivo</i> de las proteínas mitocondriales	71
2.15. Electroforesis en condiciones nativas (“Blue Native” PAGE) y ensayos de actividad en gel (IGA)	71
2.16. Geles bidimensionales (2D BN/SDS PAGE)	72
2.17. Generación de anticuerpos policlonales frente a la proteína CCDC56	72
2.18. Inmunoprecipitación de CCDC56-Flag	72
2.19. Análisis estadístico de los resultados	73
 RESULTADOS	75
1. Falta de función de CCDC56 en <i>Drosophila melanogaster</i>	78
2. CCDC56 se encuentra conservada en humanos	80
3. Caracterización funcional de CCDC56 en líneas celulares humanas	82
3.1. Generación de anticuerpos policlonales frente a la proteína CCDC56 humana	82
3.2. Generación de líneas estables de sobreexpresión y localización subcelular de CCDC56	83
3.3. Interferencia de CCDC56 en células HeLa	86

Transfección transitoria de siRNAs en células HeLa y silenciamiento de <i>CCDC56</i>	86
Curvas de crecimiento	87
Medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria	88
Evaluación de los niveles de los complejos de la cadena respiratoria totalmente ensamblados	89
Cuantificación de las proteínas de los complejos de la cadena respiratoria	90
Cuantificación de los mensajeros mitocondriales	91
Análisis <i>in vivo</i> de la síntesis de proteínas mitocondriales	92
Análisis <i>in vivo</i> de la estabilidad de las proteínas mitocondriales	94
Análisis del ensamblaje del complejo IV mediante BN-PAGE y 2D BN/SDS-PAGE	96
3.4. Rescate del fenotipo mediante la sobreexpresión de <i>CCDC56</i>	98
3.5. Sobreexpresión de <i>CCDC56</i> en células HeLa	100
Medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria	100
Evaluación de los niveles de los complejos de la cadena respiratoria totalmente ensamblados	101
Cuantificación de las proteínas de los complejos de la cadena respiratoria	102
3.6. Búsqueda de proteínas que interaccionen con <i>CCDC56</i>	103
4. Búsqueda de mutaciones en el gen <i>CCDC56</i> en pacientes con déficit del complejo IV	105
DISCUSIÓN	107
1. Identificación de <i>CCDC56</i>	109
2. <i>CCDC56</i> es una nueva proteína integral de la membrana mitocondrial interna	111
3. La disminución de <i>CCDC56</i> provoca un déficit severo y aislado de la actividad del complejo IV en la línea celular humana HeLa	113
4. <i>CCDC56</i> es una nueva proteína esencial para la formación del complejo IV en células humanas	116
5. <i>CCDC56</i> participa en la coordinación de la síntesis de COX1 con el ensamblaje del complejo IV	119
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXOS	147

ABREVIATURAS

2D BN/SDS-PAGE	Geles bidimensionales BN/SDS-PAGE
ADNc	ADN complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
BN-PAGE	<i>"Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis"</i> , Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas
CI	Complejo I, NADH deshidrogenasa
CII	Complejo II, Succinato deshidrogenasa
CIII	Complejo III, Ubiquinol:citocromo <i>c</i> oxidorreductasa
CitC	Citocromo <i>c</i>
CIV	Complejo IV, Citocromo <i>c</i> oxidasa
Cm	Cloranfenicol
CoQ	Coenzima Q ₁₀ , Ubiquinona
CoQH ₂	Ubiquinol
COX	Citocromo <i>c</i> oxidasa, Complejo IV
CTE	Cadena de transporte electrónico
Cu _A	Centro de cobre A, Grupo prostético de COX2
Cu _B	Centro de cobre B, Grupo prostético de COX2
CV	Complejo V, ATP sintasa
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DBH ₂	Decilubiquinol
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
DHODH	Dihidroorotato deshidrogenasa
DIC	Óptica de contraste interdiferencial o Nomarski
DTNB	Ácido 5-5' ditio bis 2-nitrobenzoico
ETF-QO	Flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa
FCLS	Variante franco-canadiense del síndrome de Leigh
GatC	Subunidad C de la glutamil ARNt ^{Gln} amidotransferasa
GatCAB	Glutamil ARNt ^{Gln} amidotransferasa

HRP	“ <i>Horseradish peroxidase</i> ”, peroxidasa de rábano
HSP	“ <i>Heavy strand promoter</i> ”, Promotor de la cadena pesada del ADN mitocondrial
IGA	“ <i>In-gel activity assay</i> ”, Ensayo de actividad en gel
IPTG	Isopropil- β -D-galactopiranosido
IMS	Espacio intermembrana
LS	Síndrome de Leigh
LSP	“ <i>Light strand promoter</i> ”, Promotor de la cadena ligera del ADN mitocondrial
MELAS	Miopatía mitocondrial con encefalopatía, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
ND	NADH deshidrogenasa
NTB	Azul de nitrotetrazolio
O _H	Origen de replicación de la cadena pesada
O _L	Origen de replicación de la cadena ligera
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PH3	Fosfohistona 3
qPCR	PCR cuantitativa
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SD	Sedimento
SN	Sobrenadante
TIM	Translocasa de la membrana interna
TOM	Translocasa de la membrana externa

INTRODUCCIÓN

1. La mitocondria

1.1. Origen y evolución de la mitocondria

La teoría endosimbiótica del origen de las mitocondrias fue postulada en los años 70 por F. Taylor y L. Margulis (Margulis, 1975). Esta teoría sitúa el origen de las mitocondrias hace unos 2000 millones de años, periodo en el que se produjo un drástico aumento en la concentración de O_2 de la atmósfera. En este momento tuvo lugar un fenómeno de endosimbiosis entre una célula protoeucariota huésped con metabolismo anaerobio y una α -proteobacteria aerobia que vivían de forma independiente. Según el denominado modelo Ox-Tox, la proteobacteria actuaba retirando el oxígeno del citoplasma de la célula huésped, evitando así sus efectos tóxicos, mientras que ésta le proporcionaba nutrientes, como glicerol, lípidos o aminoácidos al endosimbionte (Kurland and Andersson, 2000, Gabaldon and Huynen, 2007). Numerosos estudios filogenéticos muestran que dicho evento ocurrió una sola vez a lo largo de la evolución, y por lo tanto se admite un origen único y común del conjunto de mitocondrias presentes en los distintos organismos eucariotas (Kurland and Andersson, 2000).

A lo largo de la evolución esta proto-mitocondria fue especializándose progresivamente en el metabolismo energético, perdiendo gran parte de su proteoma original y sustituyéndolo por proteínas de la célula huésped. La replicación, transcripción, división celular o transducción de señales de la α -proteobacteria quedaron así bajo el control de la célula huésped, en un proceso que algunos autores definen como un secuestro del endosimbionte (Gabaldon and Huynen, 2007). Se

considera que la transformación de este endosimbionte en orgánulo tuvo lugar al adquirir éste la capacidad de intercambiar ATP y ADP con el citoplasma de la célula huésped, quedando integrado en el metabolismo celular (Kurland and Andersson, 2000).

Durante los millones de años de evolución conjunta, la mayor parte de los genes de la proteobacteria se han perdido o han sido transferidos al núcleo del huésped, hasta llegar a la situación actual en que el genoma mitocondrial (ADNmt) codifica un número muy reducido de genes, 37 en la mayoría de los animales (Wallace, 2005). El resto de las aproximadamente 1500 proteínas que componen el proteoma mitocondrial (Pagliarini et al., 2008) se encuentran codificadas en el núcleo, son traducidas por los ribosomas citoplasmáticos e importadas a la mitocondria. Por tanto, la mitocondria es un orgánulo semiautónomo, ya que para su correcta funcionalidad, mantenimiento y arquitectura requiere de la contribución tanto del propio genoma mitocondrial como del genoma nuclear (Garesse and Vallejo, 2001, Kelly and Scarpulla, 2004).

La mitocondria se encuentra presente en la práctica totalidad de las células eucariotas y desempeña un papel central en el metabolismo celular, puesto que en su interior tienen lugar procesos metabólicos esenciales como el ciclo de Krebs, la oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de la urea o algunas etapas de la síntesis de aminoácidos y del grupo hemo. Entre todas ellas cabe destacar la generación de energía química en forma de ATP en el proceso conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Scheffler, 2001). En los últimos años esta visión se ha ido ampliando al demostrarse la implicación de la mitocondria en un gran número de procesos celulares fundamentales como la apoptosis (Tait and Green, 2010), la señalización por calcio (Mammucari et al., 2011) o la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Starkov, 2008).

1.2. Estructura, morfología y distribución de las mitocondrias

La mitocondria es un orgánulo rodeado por una doble membrana que delimita dos compartimentos, la matriz, situada en el interior de la membrana mitocondrial interna, y el espacio intermembrana, localizado entre ambas membranas. La membrana mitocondrial externa separa el orgánulo del citoplasma y es permeable a pequeñas moléculas e iones. Además, esta membrana cuenta con un transportador, la translocasa de la membrana externa (complejo TOM), que es la principal vía de entrada a la mitocondria para las moléculas de mayor tamaño (Schmidt et al., 2010). La membrana mitocondrial interna es mucho menos permeable y necesita la presencia de transportadores, como OXA1, TIM22 o TIM23, que permiten el paso de proteínas a través de ella (Schmidt et al., 2010) y de transportadores específicos para metabolitos e iones (Arco and Satrustegui, 2005).

La membrana mitocondrial interna se encuentra plegada sobre sí misma formando unas invaginaciones lamelares, denominadas crestas, las cuales incrementan en gran medida su superficie y aumentan su capacidad funcional. En la membrana mitocondrial interna se ensambla la cadena de transporte electrónico (CTE), responsable de la síntesis de ATP, razón por la cual aquellas células

con un mayor requerimiento energético tienen una mayor densidad de crestas mitocondriales.

Tradicionalmente se ha considerado a las mitocondrias como orgánulos discretos, de forma esférica o alargada y con unas dimensiones de 3-4 μm de largo y 0.5-1 μm de diámetro. Esta visión de la mitocondria como un orgánulo individual y estático ha ido cambiando y hoy en día está bien demostrado que las mitocondrias forman un sistema reticular dinámico que va experimentando cambios en su morfología y distribución mediante continuos eventos de fusión y fisión. La morfología y la distribución de las mitocondrias en la célula no es resultado del azar, sino que se encuentran reguladas para ir adaptándose a las necesidades energéticas de la célula (Chan, 2006).

A pesar de esta situación dinámica, la masa mitocondrial se mantiene relativamente constante entre células del mismo tipo celular. Sin embargo, la cantidad de mitocondrias varía en los distintos tejidos en función de la demanda energética de cada uno (Fernandez-Vizarra et al., 2011). Es durante el proceso de biogénesis mitocondrial cuando se dota a cada tejido del número de mitocondrias con el grado de diferenciación adecuado para satisfacer sus necesidades energéticas (Fernandez-Moreno et al., 2000).

1.3. Función mitocondrial

Como se ha comentado previamente, en la mitocondria tienen lugar numerosas rutas metabólicas como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos o la síntesis de aminoácidos y del grupo hemo. Pero, sin lugar a dudas, la principal función de la mitocondria es la generación de energía en forma de ATP, pues éste se requiere para la inmensa mayoría de los procesos fisiológicos de la célula.

En la membrana mitocondrial interna se localiza la cadena de transporte electrónico, formada por cinco complejos enzimáticos multiheteroméricos responsables de llevar a cabo la fosforilación oxidativa. Este proceso permite la generación de ATP y calor gracias a la oxidación de los cofactores reducidos $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 , procedentes del catabolismo de los azúcares y los ácidos grasos (Wallace and Fan, 2010).

Los electrones provenientes de la oxidación de los cofactores son transferidos a los complejos de la CTE, concretamente al complejo I (CI, NADH deshidrogenasa) desde el $\text{NADH} + \text{H}^+$ y al complejo II (CII, succinato deshidrogenasa, SDH) desde el FADH_2 . Estos electrones son seguidamente transferidos a la ubiquinona (coenzima Q_{10} , CoQ), que una vez reducida a ubiquinol (CoQH_2) los transfiere al complejo III (CIII, ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa) y éste sucesivamente al citocromo c . Finalmente los electrones llegan al complejo IV (CIV, citocromo c oxidasa, COX) que los cede al O_2 generando H_2O (Wallace, 2005). Completan el sistema una serie de complejos accesorios, como la flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa (ETF-QO) y la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), que suministran electrones a la ubiquinona (Smeitink et al., 2006) (Figura 1).

La transferencia de electrones de unos complejos a otros se realiza a favor de potencial oxidorreductor y la energía liberada en el proceso es utilizada por los complejos I, III y IV para bombear protones al espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico a ambos lados de la membrana mitocondrial interna. Es la energía acumulada en este gradiente electroquímico de protones la que se utiliza para la síntesis de ATP. Cuando estos protones regresan a la matriz mitocondrial a través del complejo V (ATP sintasa) la disipación de energía que se produce es utilizada por éste para fosforilar el ADP generando ATP (Figura 1) (Wallace and Fan, 2010).

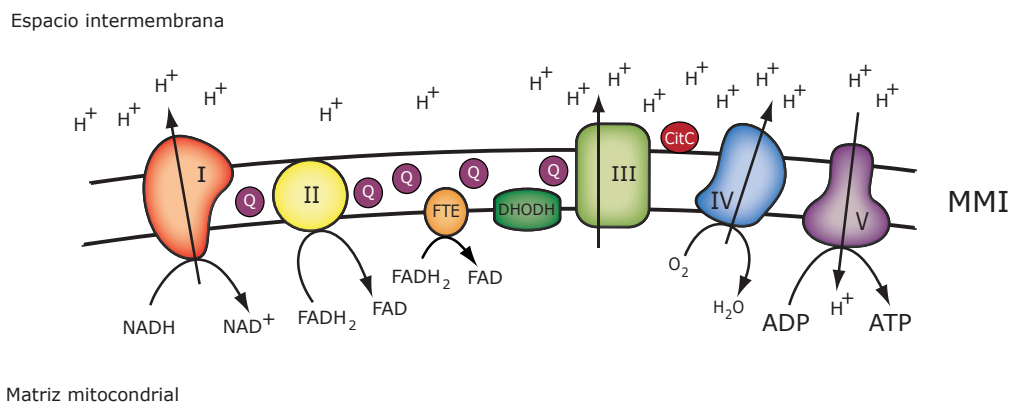


Figura 1. Sistema OXPHOS. Los coenzimas reducidos $NADH+H^+$ y $FADH_2$, provenientes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente al O_2 . La energía química acumulada en el gradiente de protones que se genera es utilizada por el complejo V para la producción de ATP. Los números I al V designan los cinco complejos de la cadena respiratoria. MMI: membrana mitocondrial interna. FTE: flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa, DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa, CitC: Citocromo c , Q: Ubiquinona.

Por otro lado, el potencial electroquímico generado por el sistema OXPHOS está implicado en el proceso de termogénesis que tiene lugar en el tejido adiposo marrón. Mediante la acción de la proteína desacoplante 1 (UCP1) la energía química generada por el gradiente de protones se disipa en forma de calor (Nicholls, 2001).

Esta energía almacenada en forma de gradiente de H^+ es empleada, además, para importar proteínas a la mitocondria o transportar, a través de la membrana mitocondrial interna, metabolitos e iones inorgánicos como sodio, fosfato, potasio o calcio. La mitocondria desempeña un papel fundamental en la homeostasis del calcio, secuestrando Ca^{2+} cuando su concentración en el citoplasma es muy elevada (Smeitink et al., 2006).

Durante la fosforilación oxidativa una pequeña proporción de los electrones reacciona con el oxígeno, transformándolo en ROS (anión superóxido, $O_2^{\cdot-}$ y peróxido de hidrógeno, H_2O_2) (Jastroch et al., 2010). Aunque elevadas concentraciones de ROS pueden resultar tóxicas para la célula, en condiciones fisiológicas desempeñan un papel importante como moléculas señalizadoras implicadas en una gran variedad de respuestas celulares tales como la muerte celular por apoptosis (Spierings et al., 2005) o la proliferación celular (Owusu-Ansah et al., 2008).

2. Estructura y metabolismo del genoma mitocondrial

2.1. Estructura y herencia del ADN mitocondrial

Desde su identificación en células de embrión de pollo en 1963 (Nass and Nass, 1963), el genoma mitocondrial ha sido secuenciado en numerosas especies. Esta secuenciación ha mostrado que el tamaño y la capacidad codificante del ADNmt son variables, oscilando entre los 67 genes de *Reclinomonas americana* a los 3 genes que codifica el ADNmt de *Plasmodium falciparum* (Gray et al., 2001).

El genoma mitocondrial es una pequeña molécula circular de ADN de doble cadena, cuyo tamaño en metazoos oscila entre las 16 y las 20 Kb. En vertebrados codifica exclusivamente 37 genes: 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 subunidades estructurales de los complejos OXPHOS, entre las que se incluyen siete subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) de las 45 que forman el complejo I, una subunidad (citocromo b, Cytb) de las 11 presentes en el complejo III, tres subunidades (COX1, COX2, COX3) de las 13 que constituyen el complejo IV y dos subunidades (ATP6 y ATP8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (Figura 2).

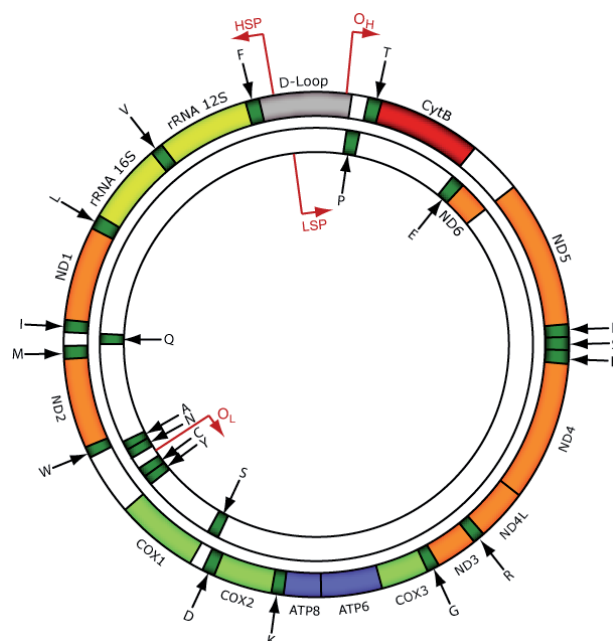


Figura 2. ADN mitocondrial humano. En esta figura se representan los 37 genes codificados por el ADNmt humano. Los ARNt se representan por el código de una letra del aminoácido correspondiente. En el exterior se representa la cadena pesada y en el interior la cadena ligera. Se indican las posiciones de los orígenes de replicación de ambas cadenas (O_H y O_L), así como los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP).

Las dos hebras del ADNmt reciben los nombres de cadena pesada (“*heavy*”, H) y cadena ligera (“*light*”, L), debido a la diferente densidad de ambas al ser separadas en gradientes de cloruro de cesio. En mamíferos, la mayor parte de los genes se encuentran codificados en la cadena pesada del ADNmt. Sin embargo, esta distribución de los genes no se ha mantenido a lo largo de la escala evolutiva y hay variaciones en su disposición entre vertebrados e invertebrados.

La estructura del ADNmt es extraordinariamente compacta, los genes no presentan intrones ni regiones 5’ o 3’ no traducidas (UTR), no hay apenas espacios intergénicos llegando a solaparse algunos de los genes y, en muchos casos, las adeninas del codón de terminación de la traducción, UAA, no están codificadas por el ADNmt sino que son añadidas por la maquinaria de poliadenilación. La mayor región no codificante, denominada D-loop en mamíferos, contiene los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción de las cadenas pesada y ligera, así como el origen de replicación de la cadena pesada (O_H). La segunda región no codificante del ADNmt es una secuencia de apenas 30 nucleótidos que contiene el origen de replicación de la cadena ligera (O_L) (Figura 2). Revisado en (Fernandez-Silva et al., 2003).

La molécula de ADNmt se encuentra empaquetada formando parte de unidades nucleoproteicas independientes, llamadas nucleoides por su analogía con los cromosomas bacterianos. Los nucleoides constituyen la unidad de transmisión y herencia del ADNmt (Spelbrink, 2010). La proteína mayoritaria encargada de empaquetar y organizar los nucleoides es el TFAM (factor de transcripción mitocondrial A), miembro de la familia de proteínas HMG (“*High Mobility Group*”, dominio de alta movilidad electroforética) de unión a ADN (Kukat et al., 2011). La proteína TFAM y su homólogo en levadura Abf2p recubren la molécula de ADNmt, uniéndose a ella cada 10-20 pb, y son esenciales para su mantenimiento y estabilidad (Larsson et al., 1998, Kanki et al., 2004). En diferentes estudios se han identificado, además, otras proteínas asociadas al nucleoide, principalmente proteínas de la maquinaria de replicación y transcripción mitocondrial, como la ADN polimerasa mitocondrial (Pol γ), la helicasa mitocondrial (TWINKLE), la proteína de unión a cadena sencilla (mtSSB) o el factor de transcripción B2 (mtTFB2) (Garrido et al., 2003), que sugieren que es en los nucleoides donde se replica y transcribe el ADNmt.

El hecho de que el ADNmt se encuentre compartimentalizado fuera del núcleo hace que su herencia sea diferente a la de los genes nucleares. El genoma mitocondrial es poliploide y dentro de la misma célula pueden coexistir distintas variantes del mismo (heteroplasmia) o ser todas idénticas (homoplasmia). Estas moléculas de ADNmt pueden replicar de manera independiente al ciclo celular y se segregan al azar durante la mitosis, dando como resultado células hijas con distinto contenido de ADNmt, fenómeno que se conoce como segregación mitótica. Además, en mamíferos el ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna, mientras que el ADNmt paterno se pierde durante las primeras rondas de replicación del embrión (Hutchison et al., 1974).

2.2. Replicación del ADN mitocondrial

La replicación del ADNmt sucede de manera continua a lo largo del ciclo celular y de forma independiente a la replicación del ADN nuclear (ADNn) (Bogenhagen and Clayton, 1977). En procesos como la embriogénesis o la diferenciación celular el ADNmt replica más de una vez en cada ciclo celular, mientras que en ocasiones sólo replica una pequeña subpoblación del ADNmt, como ocurre en la oogénesis (Wai et al., 2008). Sin embargo, trabajos recientes han descrito evidencias que sugieren que, además, el ADNn y el ADNmt podrían replicarse de manera coordinada (Ruiz De Mena et al., 2000, Martínez-Díez et al., 2006, Lee et al., 2007).

Maquinaria basal de replicación del ADN mitocondrial

Mientras que la maquinaria responsable de la replicación del ADN nuclear es muy sofisticada, el número de proteínas esenciales para la replicación del ADNmt es comparativamente pequeño. Recientemente, se ha reconstituido *in vitro* el replisoma mínimo necesario para la replicación del ADNmt en mamíferos. Está constituido por la ADN polimerasa γ , la helicasa mitocondrial TWINKLE y la proteína de unión a ADN de cadena sencilla o mtSSB, que aumenta la procesividad de las anteriores. *In vitro* estas tres proteínas son capaces de sintetizar ADN de cadena sencilla a partir de un molde de ADN de doble cadena hasta niveles similares a los observados *in vivo* (Korhonen et al., 2004).

La ADN polimerasa γ es la única polimerasa encargada de la replicación, recombinación y reparación del ADN en la mitocondria de animales (Kaguni, 2004). Pertenece a la familia A de ADN polimerasas, compuesta por enzimas replicativas y con actividad reparadora, entre las que se encuentra la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (Shutt and Gray, 2006a). La ADN polimerasa γ está compuesta por una subunidad catalítica, Pol γ - α o POLG, que posee actividad polimerasa y correctora, y una subunidad accesoria, Pol γ - β o POLG2, que aumenta la actividad catalítica y la procesividad de la Pol γ - α . En *Drosophila* estas dos subunidades forman un heterodímero, mientras que la ADN polimerasa de mamíferos es un heterotrímero formado por una subunidad catalítica y dos accesorias (Kaguni, 2004).

La subunidad catalítica tiene un tamaño de 125-140 KDa. Además de la actividad polimerizante, esta subunidad del enzima presenta actividad correctora 3'-5' exonucleasa y actividad 5'-deoxirribosa fosfato liasa, necesaria para la reparación del ADN (Longley et al., 1998). La subunidad accesoria tiene un tamaño de 35-55 KDa y presenta una gran homología estructural y de secuencia con las aminoacil-ARNt sintetasas de clase IIa. La unión de la subunidad accesoria cambia la conformación de la POLG permitiendo que interaccione con una mayor región del ADN molde, aumentando así su procesividad (Carrodegua et al., 1999).

La helicasa mitocondrial TWINKLE comparte una gran homología de secuencia con la proteína helicasa/primasa codificada por el gen 4 (gp4) del bacteriófago T7. Sin embargo,

TWINKLE no posee el dominio N-terminal de gp4 que es el que le confiere la actividad primasa (Spelbrink et al., 2001). La función de la helicasa es desenrollar la doble hélice del ADN, rompiendo los enlaces de hidrógeno que mantienen apareadas las dos cadenas de la molécula de ADNmt para permitir el paso de la ADN polimerasa sobre la cadena molde (Korhonen et al., 2003).

La mtSSB es una proteína de 13-16 KDa con una gran homología de secuencia con la SSB de *E. coli*. Durante la replicación del ADN, la doble hélice se desenrolla y las dos hebras quedan expuestas, a ellas se unen las proteínas de cadena sencilla para prevenir su renaturalización o la degradación por nucleasas. La mtSSB, además, aumenta la actividad y procesividad de POLG y la actividad helicasa de TWINKLE (Korhonen et al., 2003, Oliveira and Kaguni, 2011).

2.3. Transcripción del ADN mitocondrial

A diferencia del ADN nuclear o el ADN bacteriano, que son transcritos por ARN polimerasas multiméricas, el ADNmt se transcribe por una única ARN polimerasa monomérica (POLRMT), homóloga a las ARN polimerasas de los fagos T3 y T7 (Shutt and Gray, 2006a). En mamíferos la transcripción del ADNmt requiere además de la presencia de dos factores de transcripción, el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y el factor de transcripción mitocondrial B2 (mtTFB2) (Litonin et al., 2010, Shutt et al., 2010).

Además de su función en el mantenimiento y la estabilidad del genoma mitocondrial, el TFAM forma parte de la maquinaria basal de transcripción mitocondrial. TFAM se une a las regiones “*upstream*” de los promotores del ADNmt y recluta al heterodímero POLRMT-mtTFB2, activando así la transcripción (Falkenberg et al., 2002, Gaspari et al., 2004).

El factor de transcripción mitocondrial B2 presenta una gran homología con las ARNr dimetiltransferasas de bacterias y es esencial para activar la transcripción mitocondrial tanto *in vitro* como *in vivo* (Falkenberg et al., 2002, Matsushima et al., 2004, Adan et al., 2008). En eucariotas superiores existe un homólogo de mtTFB2, el factor de transcripción mitocondrial B1 (mtTFB1). Tanto mtTFB1 como mtTFB2 retienen la capacidad de metilar el ARNr *in vitro*, como sus homólogas las ARNr dimetiltransferasas procariotas, pero mtTFB1 presenta una mayor actividad metiltransferasa que mtTFB2 (Cotney and Shadel, 2006). *In vitro*, mtTFB1 también estimula la transcripción del ADNmt, aunque los niveles de activación son mucho menores que los obtenidos con mtTFB2. Por esta razón, inicialmente mtTFB1 fue considerado como parte de la maquinaria de transcripción del ADNmt (Falkenberg et al., 2002). Sin embargo, varios trabajos han demostrado que mtTFB1 *in vivo* no interviene en la transcripción del ADNmt, sino que es una ARNr metiltransferasa esencial para la estabilidad de los ribosomas mitocondriales (Matsushima et al., 2005, Metodiev et al., 2009).

La transcripción de las dos hebras del ADNmt se inicia en el D-loop. En esta región se encuentran los promotores para las cadenas pesada y ligera, conocidos como HSP (“*heavy strand promoter*”) y LSP (“*light strand promoter*”) respectivamente. La transcripción de la cadena ligera genera

un único ARNm policistrónico que cubre la práctica totalidad de la molécula, mientras que la cadena pesada se transcribe desde dos sitios de inicio muy próximos, H1 y H2, que generan dos transcritos solapantes, un primero que incluye los dos ARNr y un segundo que, además de los ARNr, contiene todos los genes codificados en la cadena pesada (Montoya et al., 1982, Montoya et al., 1983). Estos ARNm policistrónicos son posteriormente procesados mediante cortes endonucleolíticos a ambos lados de los ARNr, que actúan como puntos de reconocimiento entre los genes para su procesamiento (Ojala et al., 1981).

La terminación de la transcripción la lleva a cabo una familia de factores de terminación conocidos como MTERF. Esta familia de proteínas está compuesta por cuatro subfamilias, MTERF1-MTERF4, que no sólo son responsables de la terminación de la transcripción sino que desempeñan funciones heterogéneas que van desde la regulación de su iniciación a la represión de la transcripción (Roberti et al., 2009).

2.4. Traducción mitocondrial

Aunque la mayor parte del proteoma mitocondrial está codificado en el ADN nuclear, 13 de sus proteínas están codificadas en el ADNmt y son sintetizadas por la maquinaria de traducción mitocondrial. A pesar de que conserva cierta similitud con el sistema de traducción procariota, el sistema mitocondrial de síntesis de proteínas posee características propias que lo diferencian tanto del sistema de traducción bacteriano como del citoplásmico de las células eucariotas. En primer lugar, el genoma mitocondrial posee un código genético propio, distinto del universal. Además, los ARNm mitocondriales no poseen CAP ni 5'UTR y su cola de poli(A) se localiza inmediatamente tras el codón de terminación o incluso forma parte de él (Grohmann et al., 1978, Montoya et al., 1981, Ojala et al., 1981).

De todas las proteínas que componen la maquinaria de traducción mitocondrial, tan solo los ARNr 12S y 16S que forman el ribosoma mitocondrial y los ARNr están codificados en el ADNmt. El resto de componentes, incluyendo aproximadamente 80 proteínas ribosomales (MRPs), las aminoacil-ARNt sintetetas y los factores de iniciación, elongación y terminación de la traducción, están codificados en el genoma nuclear y son importados al interior de la mitocondria. En mamíferos se han identificado dos factores de iniciación de la traducción, mtIF2 y mtIF3 (Ma and Spremulli, 1995, Koc and Spremulli, 2002), cuatro factores de elongación, mtEF-Tu, mtEF-Ts, mtEFG1 y mtEFG2 (Ling et al., 1997, Xin et al., 1995, Hammarsund et al., 2001), y tres factores de terminación mitocondriales, mtRF1, mtRF1a y mtRRF (Zhang and Spremulli, 1998, Soleimanpour-Lichaei et al., 2007).

Regulación de la traducción mitocondrial

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado factores que activan de modo específico la traducción de prácticamente todas las proteínas codificadas en el ADNmt. Entre

ellos se han identificado dos proteínas, Mss551 y Pet309, necesarias para la traducción de COX1, una proteína, Pet111, necesaria para la traducción de COX2, y tres más, Pet54, Pet122 y Pet493, implicadas en la traducción de COX3 (Towpik, 2005, Soto et al., 2011).

Los ARNm mitocondriales de levadura sí que presentan una región 5'UTR, a la cual se unen estos activadores traduccionales, probablemente para favorecer el reconocimiento de los codones de inicio por parte de los mitorribosomas. Todos ellos son proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna o se encuentran asociados a ella, sugiriendo que, además de intervenir en la activación de la traducción, están implicadas en el anclaje de la maquinaria de traducción a la membrana. De esta manera se facilita la inserción en la membrana mitocondrial interna de los polipéptidos recién sintetizados y su posterior ensamblaje para formar los complejos OXPHOS (Soto et al., 2011).

En mamíferos los mecanismos de regulación de la traducción son aún poco conocidos. Los activadores traduccionales de levadura tienen una secuencia poco conservada, lo que dificulta la identificación de sus ortólogos en mamíferos y, como se ha comentado previamente, los ARNm de mamíferos no poseen región 5'UTR, sugiriendo que la regulación de la síntesis de proteínas mitocondriales sigue un mecanismo diferente al descrito en levaduras (Smits et al., 2010, Soto et al., 2011).

Recientemente se ha identificado el homólogo en humanos de Pet309, LRPPRC, en un paciente con la variante franco-canadiense del síndrome de Leigh (FCLS) (Mootha et al., 2003). LRPPRC pertenece a la familia PPR ("*pentatricopeptide repeat*"), cuyos miembros participan en el procesamiento, splicing o control traduccional del ARN. LRPPRC es necesario para la estabilidad de los ARNm mitocondriales maduros, afectando especialmente a los ARNm de COX1, COX2 y COX3, las subunidades del complejo IV codificadas en el ADNmt (Sasarman et al., 2010, Ruzzenente et al., 2011). Además de LRPPRC, se han descrito otras proteínas pertenecientes a la misma familia, como PTCD1, PTCD2 o PTCD3, que actuarían también como moduladores específicos post-transcripcionales de los ARNm mitocondriales (Rackham et al., 2009, Xu et al., 2008, Davies et al., 2009).

El primer activador traduccional específico de una proteína mitocondrial de mamíferos se identificó en 2009 en un paciente con síndrome de Leigh (LS) y un déficit aislado en la actividad del complejo IV (Weraarpachai et al., 2009). Esta nueva proteína, CCDC44 o TACO1 ("*Translational Activator of COX1*"), actúa como un activador específico de la traducción de COX1 en la mitocondria de humanos. En ausencia de TACO1, la síntesis de COX1 disminuye y aparecen productos truncados, indicando que TACO1 podría estar asegurando un inicio correcto de la síntesis de COX1 o estabilizando el polipéptido naciente y garantizando que se completa su traducción. Curiosamente, el "*knock-out*" de *YGR021W*, su ortólogo en levaduras, no presenta ningún defecto mitocondrial.

La identificación de nuevas proteínas reguladoras de la traducción y la caracterización de su mecanismo de acción permitirán un mayor conocimiento sobre la regulación de la traducción mitocondrial de mamíferos.

3. Biogénesis de los complejos de la cadena respiratoria

Una vez traducidas las proteínas codificadas en el ADNmt, éstas tienen que ensamblarse en la membrana mitocondrial interna junto con las proteínas codificadas en el ADNn, que han sido importadas a la mitocondria, para formar los complejos OXPHOS. El ensamblaje del sistema de fosforilación oxidativa es un proceso complejo en el que intervienen un gran número de chaperonas, proteasas y factores de ensamblaje que ayudan a la correcta formación de cada uno de los complejos (Fernandez-Vizarra et al., 2009).

3.1. Inserción de las proteínas en la membrana mitocondrial interna

Las proteínas codificadas en el ADNmt son altamente hidrofóbicas y tienden a formar agregados en ambientes hidrofílicos. Para evitarlo, durante su síntesis en el interior de la mitocondria, estas proteínas se insertan en la membrana mitocondrial interna de forma co-traducciona, es decir, a medida que van siendo sintetizadas por los ribosomas. Por esta razón, los ribosomas mitocondriales se encuentran próximos a la membrana mitocondrial interna y se ha propuesto que únicamente son activos aquellos que se encuentran anclados (Liu and Spremulli, 2000, Smits et al., 2010).

En *S. cerevisiae*, se han identificado dos proteínas, Oxa1 y Mba1, responsables del anclaje de los ribosomas a la membrana mitocondrial interna. Oxa1, miembro de la familia Alb3/Oxa1/YidC, es una proteína integral de membrana cuyo extremo C-terminal interacciona con la subunidad grande del ribosoma (Szyrach et al., 2003, Jia et al., 2003). Oxa1 coopera con Mba1, una proteína asociada a la membrana mitocondrial interna, que actúa como receptor de los ribosomas y facilita su colocación en la orientación correcta para la inserción de los polipéptidos nacientes en la membrana (Ott et al., 2006).

Se ha identificado el homólogo en humanos de Oxa1, denominado OXA1L. La sobreexpresión de esta proteína es capaz de complementar el defecto de COX de una cepa de *S. cerevisiae* que porta mutaciones en el gen *oxa1*, sugiriendo que la proteína humana y la de levadura desempeñan funciones parecidas (Bonnefoy et al., 1994).

Por otro lado, y como se ha comentado anteriormente, los activadores de la traducción descritos en mitocondria son proteínas de membrana que se unen a los ARN que están siendo traducidos, facilitando también el anclaje de la maquinaria de traducción a la membrana. Este acoplamiento de la síntesis de proteínas con la inserción de los polipéptidos en la membrana favorece la eficiencia del ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria.

3.2. Ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria

Cada uno de los complejos de la cadena respiratoria tiene una ruta específica de ensamblaje, mediante la cual se van uniendo las distintas subunidades que lo componen hasta formar el complejo totalmente ensamblado. En el ensamblaje de cada complejo intervienen chaperonas que no forman parte del complejo maduro, pero que son esenciales para su correcta formación: los factores de ensamblaje.

Hasta la fecha se han identificado factores de ensamblaje para los cinco complejos y la lista se encuentra en continuo crecimiento. En humanos se han identificado NDUFA12L, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, C6ORF66, Ecsit, C8ORF38, C20ORF7, AIF o IND1 que participan en el ensamblaje del complejo I, SDHAF1 y SDHAF2 que participan en la formación del complejo II, BCS1L y TTC9 que participan en el ensamblaje del complejo III y ATP11 y ATP12 que intervienen en la formación del complejo V. Entre los factores de ensamblaje del complejo IV caracterizados hasta la fecha se encuentran SURF1, COX15, COX10, SCO1, SCO2 o COX17. Defectos en cualquiera de estas proteínas tienen como consecuencia un bloqueo en el ensamblaje del complejo, dando como resultado una disminución del mismo y en muchos casos una acumulación de los intermediarios de ensamblaje o subcomplejos (Fernandez-Vizarra et al., 2009, Diaz et al., 2011).

Los complejos ya ensamblados no se encuentran distribuidos al azar en la membrana mitocondrial interna, sino que se encuentran formando unas estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos (Schagger and Pfeiffer, 2000). En la mitocondria de mamíferos, prácticamente todo el complejo I se encuentra formando parte de supercomplejos que contienen el CI y el CIII (I_1III_2) o el CI, CIII y CIV ($I_1III_2IV_{0.4}$), mientras que los complejos II y IV se encuentran en su mayoría como entidades individuales (Schafer et al., 2006). Los supercomplejos son unidades funcionales que llevan a cabo la respiración, probablemente dando estabilidad a los complejos individuales y permitiendo una mayor eficiencia en el paso de los electrones de un complejo a otro (Schafer et al., 2006, Acin-Perez et al., 2008).

3.3. Biogénesis de la citocromo *c* oxidasa

Estructura de la citocromo c oxidasa

Como se ha comentado previamente, la citocromo *c* oxidasa es el complejo de la cadena respiratoria responsable de transferir los electrones del citocromo *c* al O_2 . La citocromo *c* oxidasa bovina fue el primer complejo de la cadena respiratoria en ser cristalizado y su estructura fue resuelta a 2.8 Å. En mamíferos, COX es un complejo de unos 200 KDa formado por 13 subunidades: COX1, COX2 y COX3, codificadas en el ADNmt, y COX4, COX5a, COX5b, COX6a, COX6b, COX6c, COX7a, COX7b, COX7c y COX8, codificadas en el ADNn (Tsukihara et al., 1996).

COX es activa en forma de dímero y requiere varios grupos prostéticos para llevar a cabo su función, dos grupos hemo (a y a_3), dos centros de cobre (Cu_A y Cu_B) y átomos de zinc y magnesio. Tanto el hemo a como el centro binuclear hemo a_3 - Cu_B se encuentran incluidos en COX1, mientras que el centro de cobre Cu_A está incluido en COX2. COX5b contiene un átomo de Zn^{2+} y entre COX1 y COX2 se localiza un átomo de Mg^{2+} (Tsukihara et al., 1995).

Las subunidades COX1, COX2 y COX3 constituyen el centro catalítico del enzima. COX1 y COX2 llevan a cabo las reacciones redox de transferencia de electrones desde el citocromo c al O_2 , mientras que COX3 interviene en la translocación de 2H^+ al espacio intermembrana por cada electrón transferido (Belevich et al., 2006). El resto de subunidades que componen el complejo IV participan en la regulación de la actividad y dan estabilidad al complejo totalmente ensamblado (Li et al., 2006, Galati et al., 2009, Pierron et al., 2011).

Ensamblaje de la citocromo c oxidasa

El ensamblaje del complejo IV es un proceso lineal que se caracteriza por la incorporación de forma ordenada y secuencial de las distintas subunidades y cofactores que lo forman. A lo largo del ensamblaje aparecen tres intermediarios, conocidos como S1, S2 y S3, que muy probablemente representan los pasos limitantes del proceso (Nijtmans et al., 1998).

El primer paso en el ensamblaje de COX consiste en la inserción de COX1 en la membrana mitocondrial interna, formando lo que se conoce como subcomplejo S1, al cual se unen los cofactores hemo a , hemo a_3 y Cu_B . Este paso va seguido de la incorporación de COX4 y COX5a, formando el segundo intermediario de ensamblaje, S2 (Antonicka et al., 2003a, Antonicka et al., 2003b, Williams et al., 2004). A continuación, COX2 unido a su grupo prostético Cu_A se une al subcomplejo S2. La unión de COX2 desencadena una cascada rápida de incorporación de proteínas, empezando por COX3, para dar lugar al subcomplejo S3. Este subcomplejo está formado por prácticamente todas las proteínas del complejo IV excepto COX6a, COX6b y bien COX7a o COX7b (Williams et al., 2004, Stiburek et al., 2005, Massa et al., 2008). La unión de estas subunidades completa la formación del holoenzima monomérico, también llamado S4 (Figura 3) (Nijtmans et al., 1998). Posteriormente, se produce la dimerización del monómero de COX. El dímero, considerado la forma activa del enzima, está formado por dos monómeros conectados por una molécula de cardiolipina (Fernandez-Vizarra et al., 2009).

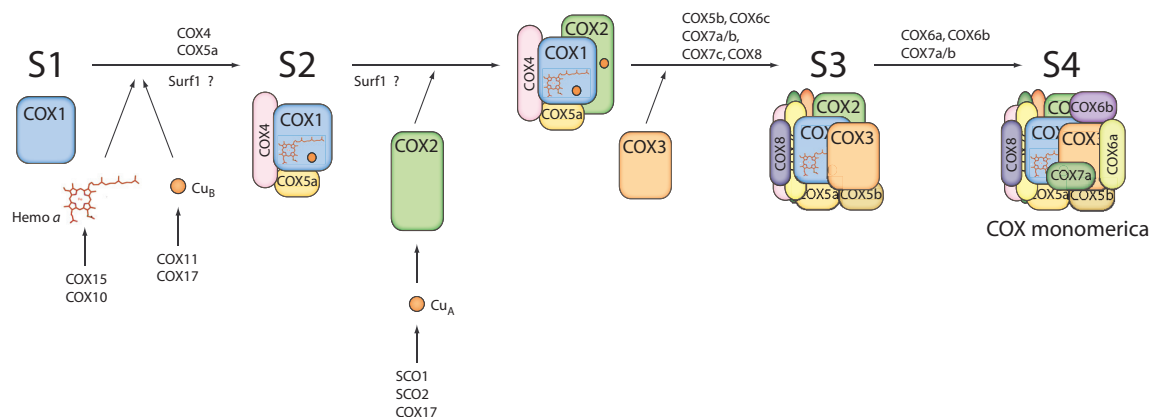


Figura 3. Ensamblaje del complejo IV en humanos. Las subunidades que componen el complejo IV se van ensamblando de forma secuencial y ordenada. Están representados los tres intermediarios de ensamblaje del complejo IV (S1, S2 y S3) así como el monómero de COX totalmente ensamblado (S4). Asimismo se han indicado los factores de ensamblaje principales que intervienen en cada paso. Adaptado de (Fernandez-Vizarra et al., 2009).

En *S. cerevisiae* se han identificado más de 20 proteínas accesorias y factores de ensamblaje necesarios para que la formación del complejo IV se produzca de forma correcta. A pesar de que en humanos se encuentran ortólogos para muchas de ellas, el conocimiento que tenemos del proceso de ensamblaje del complejo IV es aún incompleto y quedan por identificar muchos factores que intervienen en él (Barrientos et al., 2009).

El primer factor de ensamblaje identificado en humanos fue SURF1, una proteína integral de la membrana mitocondrial interna de unos 30 KDa. Desde su identificación en 1998 se han descrito más de 40 mutaciones patogénicas en este gen en pacientes de síndrome de Leigh con déficit de COX (Tiranti et al., 1998, Zhu et al., 1998). Estos pacientes presentan bajos niveles de complejo IV totalmente ensamblado y una acumulación de los subcomplejos S1 y S2. Aunque se desconoce su función exacta, esta acumulación de S1 y S2 indica que SURF1 estaría participando en las primeras etapas del ensamblaje de COX, probablemente antes de la incorporación de COX2 al complejo (Tiranti et al., 1999b, Coenen et al., 1999, Stiburek et al., 2005).

El homólogo de SURF1 en levaduras, Shy1p, participa en distintos pasos de la formación del complejo IV que van desde la traducción de Cox1p, al ensamblaje de COX o la formación de los supercomplejos III+IV (Mick et al., 2007).

Existen ortólogos de SURF1 en numerosos procariotas en los que COX únicamente está compuesto por las tres subunidades que constituyen el centro catalítico, apoyando que SURF1 participe en la formación del mismo. En bacterias, SURF1 es capaz de unir hemo y es esencial para el mantenimiento de éste en el centro activo de COX, por lo que se ha propuesto que SURF1 podría estar participando en la inserción del hemo a en COX1 o la estabilización del centro hemo a_3 -Cu_B (Smith et al., 2005, Hannappel et al., 2011).

Los pasos finales de la síntesis de este grupo hemo *a* están catalizados por los enzimas COX10 y COX15, localizados en la membrana mitocondrial interna. COX10 es una hemo α :farnesiltransferasa que cataliza la conversión del protohemo (hemo *b*) a hemo *o*. COX15, a su vez, transforma este hemo *o* en hemo *a*, el grupo prostético de COX.

Se han asociado mutaciones en COX10 y COX15 a numerosos fenotipos como leucodistrofia, tubulopatía renal, cardiomiopatía infantil severa o síndrome de Leigh (Valnot et al., 2000b, Antonicka et al., 2003a, Antonicka et al., 2003b). Estos pacientes presentan muy bajos niveles de hemo *a* y de complejo IV totalmente ensamblado y no acumulan ningún intermediario de ensamblaje, sugiriendo que la incorporación del grupo hemo en COX1 tiene lugar antes de la formación del subcomplejo S2 (COX1-COX4-COX5a) (Antonicka et al., 2003a, Antonicka et al., 2003b, Coenen et al., 2004).

Además de la incorporación del grupo hemo en COX1, un paso fundamental en la maduración de COX1 y COX2 es la formación de sus centros de cobre Cu_B y Cu_A . Para su incorporación en COX, el cobre, que se encuentra almacenado en la matriz mitocondrial, tiene que ser transportado hasta el espacio intermembrana (IMS, “*intermembrane space*”). En el IMS se localiza COX17, una metalochaperona con un dominio CCxC de unión a cobre, que une los átomos de Cu^{2+} y se encarga de transferirlos a COX11, SCO1 y SCO2, las chaperonas responsables de su inserción en los centros de cobre de COX1 y COX2 (Horng et al., 2004, Leary et al., 2009, Leary, 2010).

Para la formación de Cu_B , es aceptado que COX17 transfiere los átomos de cobre a COX11 que, a su vez, facilita la inserción de los mismos en COX1. Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo se produce esta transferencia es aún desconocido (Figura 4) (Hiser et al., 2000).

SCO1 y SCO2 son dos metalochaperonas con una gran homología de secuencia, responsables de la formación del centro de cobre Cu_A en COX2. A pesar de su gran similitud, son necesarios ambos factores SCO para la formación del complejo IV, proceso en el que desempeñan funciones cooperativas pero independientes. Mutaciones en cualquiera de estos genes producen un déficit severo de COX que causa encefalocardiomiopatía neonatal, fallo hepático o coma cetoacídico. En estos pacientes se acumula el subcomplejo S2, indicando que la unión del cobre a COX2 es esencial para que prosiga el ensamblaje del complejo IV (Papadopoulou et al., 1999, Valnot et al., 2000a, Leary et al., 2004).

SCO1 y SCO2 son proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna, que presentan un motivo Cx_3C de unión a cobre expuesto hacia el espacio intermembrana. SCO1 y SCO2 reciben el cobre de COX17 y tras su unión a COX2, le transfieren, de forma simultánea o secuencial, los dos átomos que formarán el centro de cobre Cu_A (Horng et al., 2005, Cobine et al., 2006, Banci et al., 2008). Tras la transferencia del cobre a COX2, SCO2 actúa como una tiol-disulfuro oxidorreductasa que reoxida las cisteínas de SCO1, permitiendo así que ambos SCO vuelvan a

recibir cobre de COX17 y comience un nuevo ciclo (Figura 4). Adicionalmente, se ha demostrado que SCO2 es esencial para la síntesis de COX2 (Leary et al., 2009).

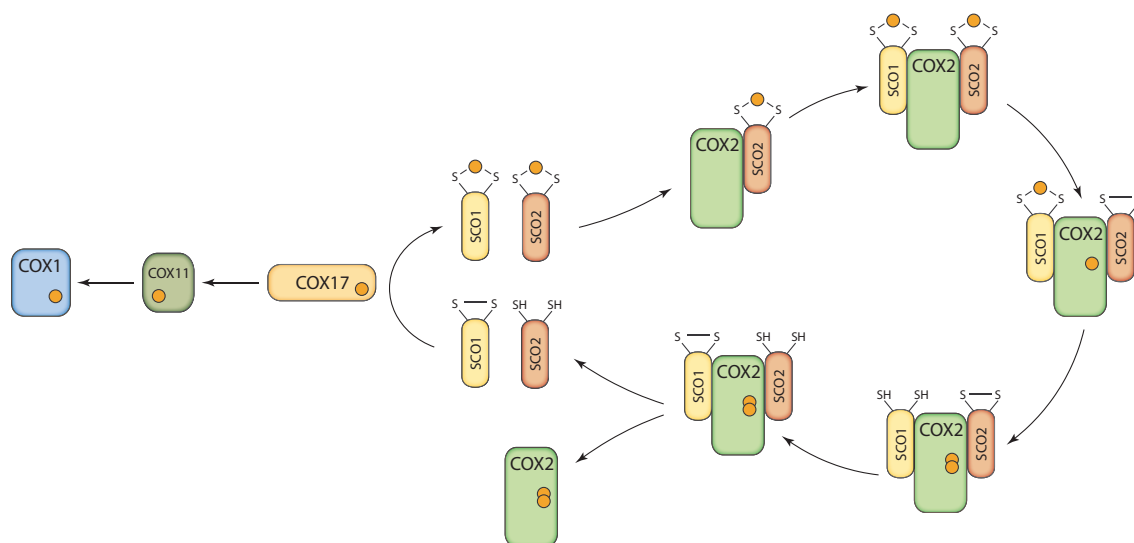


Figura 4. Formación de los centros de cobre de COX1 y COX2 en humanos. En la figura se muestran esquemáticamente los pasos necesarios para la formación de Cu_A y Cu_B . Para la formación de Cu_B , COX17 transfiere el cobre (círculo naranja) a COX11 y éste a su vez, lo transfiere a COX1. La formación del centro de cobre Cu_A la llevan a cabo SCO2 y SCO1 que, a través de las reacciones redox mostradas en la figura, transfieren cada una un átomo de cobre a COX2. Adaptado de (Leary et al., 2009).

En el IMS se encuentran, además, otras proteínas con dominios C_xC como COX19, COX23, CMC1 y CMC2, cuyos homólogos en levadura también intervienen en el transporte de cobre desde la matriz hasta el complejo IV, aunque su función no está aún bien caracterizada (Longen et al., 2009, Soto et al., 2011). Recientemente, se ha identificado en dos pacientes con cardiomiopatía neonatal una mutación en *C2orf64*. *C2orf64* presenta dos motivos C_xC y es el homólogo en humanos de Pet191p, un factor de ensamblaje del complejo IV en levaduras. En estos pacientes se acumula el subcomplejo S1, indicando que *C2orf64* también es esencial para el ensamblaje del complejo IV en células humanas (Huigslout et al., 2011).

Además de todos estos factores, se han identificado los homólogos en humanos de otros factores de ensamblaje de *S. cerevisiae*, como es el caso de COX18 y COX20, las chaperonas de COX2, aunque su función en humanos aún no ha sido caracterizada.

A pesar de los avances, nuestro conocimiento sobre la biogénesis del complejo IV es aún incompleto. Es de una gran relevancia la búsqueda de nuevos factores que participan en este proceso y el estudio de sus mecanismos de regulación ya que, como se ha comentado previamente, defectos en la formación de este complejo son la causa de un gran número de patologías humanas (Soto et al., 2011).

4. Patología mitocondrial

Dado el papel central que la mitocondria desempeña en la fisiología celular, no es de extrañar que defectos en la función mitocondrial y, en particular, defectos en la síntesis de ATP sean la causa de un amplio número de patologías. Las enfermedades mitocondriales son un conjunto de patologías heterogéneas, generalmente multisistémicas, que afectan a aquellos tejidos con una mayor demanda energética como cerebro, músculo o corazón. Entre las presentaciones clínicas se incluyen miopatías, cardiomiopatías, demencia, disfunción renal, fallo hepático, ataxia, ceguera o sordera. Las particulares características de la genética mitocondrial hacen que un determinado fenotipo pueda estar causado por distintas mutaciones y a su vez, una misma mutación puede causar distintos fenotipos (Wallace, 2010). Debido al amplio espectro de presentaciones clínicas y a la dificultad de asociar fenotipo y genotipo es difícil calcular la prevalencia de estas enfermedades, aunque se estima que en su conjunto afectan a uno de cada 5000 nacidos (Schaefer et al., 2008).

Debido al origen dual del proteoma mitocondrial, las enfermedades mitocondriales pueden estar causadas por mutaciones en los genes codificados en el ADNmt o mutaciones en los genes nucleares que codifican proteínas de destino mitocondrial. Hasta la fecha se han descrito más de 150 mutaciones que afectan a todos los genes codificados en el ADNmt, los 22 ARNt, los 2 ARNr y los 13 genes que codifican subunidades estructurales de los complejos OXPHOS (<http://www.mitomap.org>). Por otro lado, las mutaciones en el ADNn pueden afectar a genes que codifican subunidades estructurales de los complejos de la cadena respiratoria, a genes que codifican la maquinaria de importación mitocondrial y los factores de ensamblaje, a genes implicados en el mantenimiento y la expresión del ADNmt o a genes implicados en la dinámica y mantenimiento de las membranas mitocondriales. Se estima que estos defectos en el ADNn constituyen aproximadamente el 80-85% de las enfermedades mitocondriales (Calvo and Mootha, 2010).

Los déficits del complejo IV son uno de los defectos más comunes de la cadena respiratoria. Los déficit aislados de COX se pueden deber a mutaciones en cualquiera de las subunidades estructurales del complejo, ya estén codificadas en el ADNmt o en el núcleo, o a mutaciones en alguno de sus factores de ensamblaje o traducción (Diaz, 2010).

Hasta la fecha se han descrito mutaciones en COX1, COX2 y COX3, las tres subunidades de COX codificadas en el ADNmt. A pesar de que en todos los pacientes están afectados el ensamblaje o la estabilidad del complejo IV, sus presentaciones clínicas varían desde miopatía, esclerosis lateral amiotrófica o encefalomiopatía, hasta MELAS (miopatía mitocondrial con encefalopatía, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares) o anemia sideroblástica (Manfredi et al., 1995, Gattermann et al., 1997, Comi et al., 1998, Clark et al., 1999). La primera mutación en un gen estructural del complejo IV codificado en el ADNn se identificó en 2008 en dos hermanos con una encefalopatía infantil severa que portaban una mutación en COX6b1 (Massa et al., 2008).

La mayor parte de las enfermedades que cursan con deficiencia aislada de COX se deben a mutaciones en genes que intervienen en la biogénesis de este complejo. El síndrome de Leigh fue la primera enfermedad mitocondrial en que se identificó un defecto de COX de origen nuclear. Los pacientes de LS sufren una neurodegeneración progresiva fatal de inicio temprano. Estos pacientes presentan lesiones necróticas en áreas subcorticales del cerebro y desarrollan oftalmoparesis, nistagmo, ataxia, distonía y atrofia óptica. Aunque las mutaciones en SURF1 son la principal causa de síndrome de Leigh, se han descrito también mutaciones en COX10, COX15 y el factor de traducción TACO1 como causantes de esta enfermedad (Tiranti et al., 1998, Zhu et al., 1998, Coenen et al., 2004, Oquendo et al., 2004, Weraarpachai et al., 2009). Mutaciones en LRPPRC, a su vez, producen una variante menos severa de esta enfermedad, conocida como la variante franco-canadiense del síndrome de Leigh por ser exclusiva de la región de Quebec (Mootha et al., 2003).

Como hemos comentado anteriormente, mutaciones en un mismo gen pueden ser causantes de distintos fenotipos. Aunque las mutaciones en SURF1 producen generalmente síndrome de Leigh, se han identificado dos casos en los que los pacientes presentaban leucodistrofia (Rahman et al., 2001) o hipertriosis (Von Kleist-Retzow et al., 2001). Éste es también el caso de COX10 y COX15, ya que mutaciones en estos genes han sido descritas además como causantes de cardiomiopatía, leucodistrofia, tubulopatía o cardiomiopatía hipertrófica (Valnot et al., 2000b, Antonicka et al., 2003b, Coenen et al., 2004).

Por otro lado, mutaciones en SCO1 y SCO2, responsables de la formación del centro de cobre de COX2, son causantes de cardiomiopatía hipertrófica y encefalomiopatía (Papadopoulou et al., 1999, Stiburek et al., 2009). Aunque también se ha descrito una mutación en SCO1 en un paciente que presentaba hepatopatía y coma cetoacídico (Valnot et al., 2000a). Recientemente se ha identificado una mutación en un nuevo factor de ensamblaje del complejo IV, C2orf64, en dos hermanos que presentaban cardiomiopatía hipertrófica (Huigsloot et al., 2011).

A pesar de los avances alcanzados en los últimos años, aún se desconoce la causa genética de la mayor parte de las enfermedades causadas por defectos en el complejo IV. La identificación de nuevos genes implicados en este proceso será fundamental para el diagnóstico de estos pacientes y para completar el conocimiento que tenemos de la formación de COX.

5. *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para el estudio de la fisiopatología mitocondrial

Drosophila melanogaster constituye un excelente modelo para el estudio de procesos biológicos complejos ya que es fácilmente manejable tanto a nivel genético como bioquímico, fisiológico o molecular. Presenta numerosas características que hacen que su manipulación sea muy sencilla. Entre ellas destacan su ciclo de vida corto, la facilidad de crecimiento de los animales, la disponibilidad de

la secuencia completa de su genoma o el elevado número de herramientas genéticas y moleculares disponibles que permiten la manipulación y generación de moscas transgénicas con relativa facilidad. Por esta razón *D. melanogaster* ha sido utilizada en numerosos estudios de desarrollo, diferenciación, envejecimiento, ciclo celular, transducción de señales, respuesta a hipoxia o control transcripcional y traduccional. Además, *Drosophila* presenta ortólogos de numerosos genes implicados en enfermedades humanas que hacen de este organismo un buen modelo para el estudio de sus bases moleculares y el descubrimiento de nuevas terapias (Sanchez-Martinez et al., 2006).

En el caso de las enfermedades mitocondriales, *Drosophila* ha sido estudiada como modelo del síndrome de depleción mitocondrial, sordera, encefalopatía o déficits de coenzima Q (Lefai et al., 2000, Toivonen et al., 2001, Zordan et al., 2006, Grant et al., 2010, Ghezzi et al., 2011). *D. melanogaster* ha sido además, el primer organismo en el que se han descrito y estudiado mutaciones patogénicas en el ADNmt, más concretamente en el gen *ATP6*, que reproducían el fenotipo observado en encefalomiopatías humanas (Celotto et al., 2006).

5.1. Identificación de nuevos genes mitocondriales en *Drosophila melanogaster*

Drosophila ha sido de gran utilidad para el estudio de la mitocondria no solo en situaciones patológicas, sino también fisiológicas. Durante los últimos años, una de las líneas de trabajo de nuestro laboratorio se ha centrado en la identificación y caracterización de factores esenciales en el proceso de biogénesis mitocondrial, utilizando *D. melanogaster* como sistema modelo. Entre ellos se encuentran proteínas implicadas en replicación y transcripción del ADNmt, tales como las dos subunidades de la ADN polimerasa mitocondrial, Pol γ - α y Pol γ - β , la helicasa mitocondrial o los factores de transcripción y traducción mitocondrial, mtTFB2 y mtTFB1 respectivamente.

Durante la identificación del inicio de transcripción del gen *pol* γ - β observamos que el mensajero que la codifica presentaba una región 5'UTR inusualmente larga. El análisis de esta región nos permitió identificar una pauta abierta de lectura (ORF, “open reading frame”) con su codón de terminación solapando con el de inicio de la traducción de Pol γ - β (AUGA) (Figura 5). Esta ORF codifica una proteína implicada en traducción mitocondrial, GatC. Esta proteína es una de las subunidades que componen el enzima trimérico glutamil ARNt^{Gln} amidotransferasa (GatCAB), implicado en la formación del Gln-ARNt^{Gln} mitocondrial mediante una reacción de transamidación. La falta de glutaminil-ARNt sintetasa en mitocondrias es compensada por una glutamil-ARNt sintetasa no discriminante que aminoacila de forma incorrecta el ARNt^{Gln} con el aminoácido glutámico (Glu-ARNt^{Gln}). En un segundo paso, el enzima GatCAB se encarga de catalizar la transferencia de un grupo amino al aminoácido glutámico del Glu-ARNt^{Gln}, dando lugar al ARNt de glutamina correctamente cargado, Gln-ARNt^{Gln} (Nagao et al., 2009).



Figura 5. Estructura del ARNm bicistrónico *gatC/pol γ-β* de *Drosophila melanogaster*. En *D. melanogaster*, los genes *gatC* y *pol γ-β* se encuentran codificados en un mensajero bicistrónico que presenta una estructura típicamente procariota. El codón de terminación de la traducción de GatC se encuentra solapado con el codón de inicio de la traducción de Pol γ - β (AUGA). Este ARNm no presenta región 3' UTR. En amarillo se representa la región 5'UTR y se encuentra indicado el tamaño en pares de bases (pb) de cada una de las ORF.

Esta disposición de *gatC* y *pol γ-β* en un mismo ARNm es típica de mensajeros policistrónicos procariotas donde se busca un control de la estequiometría de las proteínas codificadas en ellos, que generalmente participan en un mismo proceso. El hecho de que proteínas implicadas en la replicación del ADNmt y en la traducción de los ARNm mitocondriales estén codificadas en el mismo mensajero sugiere que ambos procesos deben encontrarse coordinados y que deben existir mecanismos de regulación traduccional que establezcan el balance adecuado de estas proteínas.

Esta disposición de dos genes en un bicistrón no es exclusiva de *gatC* y *pol γ-β*. El estudio del factor de traducción mtTFB1 de *D. melanogaster* nos ha permitido la identificación de una segunda proteína, CCDC56 (“coiled-coil domain containing 56”), que se encuentra codificada en lo que considerábamos la región 5'UTR de su mensajero (Figura 6).



Figura 6. Estructura del ARNm bicistrónico *CCDC56/mtTFB1* de *Drosophila melanogaster*. En *D. melanogaster*, el gen *mtTFB1* se encuentra codificado en un mensajero bicistrónico junto con *CCDC56*, que codifica una proteína de función desconocida y potencial destino mitocondrial. En amarillo se representan las regiones 5' y 3' UTR y se encuentra indicado el tamaño en pares de bases de cada una de las ORF.

CCDC56 codifica una nueva proteína de potencial destino mitocondrial y de función desconocida. El gran paralelismo de este bicistrón con el ARNm *gatC/pol γ-β*, el papel que juega mtTFB1 en la traducción de los mensajeros mitocondriales y el posible destino mitocondrial asignado por las bases de datos a CCDC56 hacen de ella una excelente candidata a ser una nueva proteína que ejerza su función en la mitocondria.

La reciente secuenciación del genoma de doce especies de *Drosophila* ha revelado la existencia de al menos un centenar de bicistrones en este organismo (Clark et al., 2007, Lin et al., 2007), haciendo de *Drosophila* un excelente modelo para la identificación de nuevos genes mitocondriales.

OBJETIVOS

Drosophila melanogaster ha demostrado ser un buen sistema modelo para la caracterización de genes ortólogos a genes humanos, mostrando éstos una alta correspondencia funcional. Entre estos genes se incluyen aquellos implicados en biogénesis mitocondrial como *Pol γ-β*, *mtSSB*, *mtTFB2* o *mtTFB1*.

Durante la caracterización funcional del factor de traducción mitocondrial *mtTFB1* hemos identificado la presencia de una pauta abierta de lectura, *CCDC56*, que codifica una proteína con un posible destino mitocondrial y función desconocida.

Aún se desconoce la causa genética de la mayor parte de las enfermedades mitocondriales por lo que la identificación y la caracterización funcional de nuevos genes y proteínas mitocondriales es imprescindible para comprender la fisiopatología de este complejo grupo de enfermedades.

Por estas razones los objetivos que nos hemos planteado en este trabajo han sido:

- Identificar la presencia del gen *CCDC56* en el genoma humano
- Confirmar la localización de esta proteína en la mitocondria de humanos
- Caracterizar funcionalmente las consecuencias de la falta de función de *CCDC56* en células humanas mediante silenciamiento de su expresión utilizando técnicas de interferencia de ARN.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Reactivos, soluciones y tampones.

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para la Biología Molecular. La composición de las soluciones y tampones empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de los métodos o, en su defecto, en la bibliografía correspondiente.

1.2. Radioisótopos

El aminoácido radiactivo L-[³⁵S]-Metionina fue suministrado por Perkin Elmer.

1.3. Líneas celulares

Para los ensayos de interferencia y sobreexpresión de CCDC56 se utilizó la línea celular humana HeLa, procedente de un carcinoma cervical.

1.4. Cepas bacterianas

Para la transformación y amplificación de plásmidos se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli*. Para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizó la cepa BL21 CodonPlus (Stratagene).

1.5. Vectores

Los vectores utilizados en este trabajo se detallan a continuación:

- pIRESpuro2: Vector de expresión eucariota bajo el control del promotor de CMV (Clontech). Utilizado en la sobreexpresión de *CCDC56* en células humanas.
- pRSET B: Vector para la expresión en *E. coli* de proteínas de fusión con una cola de 6xHis bajo el control del promotor de T7. Se utilizó para la generación de anticuerpos.

1.6. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. En la tabla se especifica el nombre y la secuencia en dirección 5'→ 3'. La inserción de secuencias de reconocimiento por enzimas de restricción se destaca en **negrita** y los cambios con respecto a la secuencia original, en caso de haberlos, se reflejan en **naranja**.

Oligonucleótidos para el clonaje de CCDC56 en pRSET B

Nombre	Secuencia
pRSETB CCDC56 Fw	5' TT CCATGG CG TCT TCG GGA GCT GGT GAC CC 3'
pRSETB CCDC56 Rv	5' AG AAGCTT TTA GGA CCC TGA CGC CCT TGC CAG AG 3'

Oligonucleótidos para el clonaje de CCDC56 en pIRESpuro2

Nombre	Secuencia
HA-CCDC56 Fw	5' TT CTTAAG ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GTC ATG GCG TCT TCG GGA GCT GGT GAC CC 3'
HA-CCDC56 Rv	5' TT GCGGCCGC TTA GGA CCC TGA CGC CCT TGC C 3'
CCDC56-Flag Fw	5' TT CTTAAG ATG GCG TCT TCG GGA GCT GGT G 3'
CCDC56-Flag Rv	5' AT GCGGCCGC TTA CTT GTC GTC ATC GTC TTT GTA GTC GGA CCC TGA CGC CCT TGC CAG AGC TCG 3'

Oligonucleótidos para PCR cuantitativa de los ARNm mitocondriales

Nombre	Secuencia
COX1 Fw	5' CTC TTC GTC TGA TCC GTC CT 3'
COX1 Rv	5' ATT CCG AAG CCT GGT AGG AT 3'
COX2 Fw	5' ACG AGT ACA CCG ACT ACG GC 3'
COX2 Rv	5' CGG GAA TTG CAT CTG TTT TT 3'
COX3 Fw	5' CCC ACC AAT CAC ATG CCT AT 3'
COX3 Rv	5' GTG GCC TTG GTA TGT GCT TT 3'
ND5 Fw	5' AAA CAA CCC AGC TCT CCC TAA 3'

ND5 Rv	5' AGA AGG ATA TAA TTC CTA CG 3'
CytB Fw	5' TGA AAC TTC GGC TCA CTC CT 3'
CytB Rv	5' AGA ATA TTG AGG CGC CAT TG 3'
ATP6 Fw	5' TTT CCC CCT CTA TTG ATC CC 3'
ATP6 Rv	5' TGG GTG GTT GGT GTA AAT GA 3'
RNR1 Fw	5' CGA TCA ACC TCA CCA CCT CT 3'
RNR1 Rv	5' TGC TAA ATC CAC CTT CGA CC 3'
18S Fw	5' CCA GTA AGT GCG GGT CAT AAG C 3'
18S Rv	5' CCT CAC TAA ACC ATC CAA TCG G 3'

Oligonucleótidos para secuenciación de CCDC56 en pacientes con déficit del complejo IV

Nombre	Secuencia
CCDC56 1Fw	5' ACA ACT CCC AGA GTC CAC TG 3'
CCDC56 1Rv	5' CTC TCC CAA ATC AGT GAT TCC 3'
CCDC56 2Fw	5' AAG AGT GGT AGA GCA AAT CTA G 3'
CCDC56 2Rv	5' AGC ATG AAG TGC CAT ATG CTG 3'

1.7. siRNAs y sondas Taqman

Para los ensayos de interferencia transitoria del ARN mensajero de *CCDC56* humano se utilizaron los ARNs de doble cadena (siRNAs) diseñados y sintetizados por Applied Biosystems que se detallan a continuación (<http://www5.appliedbiosystems.com/tools/sirna/>):

- Silencer® Select predesigned siRNA, ID: s26294
- Silencer® Select predesigned siRNA, ID: s26295
- Silencer® Select predesigned siRNA, ID: s26296

Como control negativo en los ensayos de interferencia transitoria se utilizó el siRNA Silencer® Negative Control #2 (Ki #2) (Applied Biosystems) que no presenta homología de secuencia con ningún gen conocido y que ha sido validado en células humanas.

Para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero de *CCDC56* humano mediante PCR cuantitativa se utilizaron los siguientes ensayos Taqman, obtenidos de Applied Biosystems:

- Taqman Hs00360235_m1: para la cuantificación del ARNm de *CCDC56* humano.
- Taqman Hs99999901_s1: para la cuantificación del ARNr 18S, utilizado como control endógeno.

1.8. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo están reflejados en las siguientes tablas.

Anticuerpos primarios

Nombre	Origen	Dilución	Procedencia
Anti-COX1	Monoclonal de ratón	1:1000	Mitosciences
Anti-COX2	Monoclonal de ratón	1:500	Mitosciences
Anti-COX3	Monoclonal de ratón	1:250	Mitosciences
Anti-COX4	Monoclonal de ratón	1:250	Mitosciences
Anti-COX5a	Monoclonal de ratón	1:1000	Mitosciences
Anti-NDUFA9	Monoclonal de ratón	1:1000	Mitosciences
Anti-CII 70KDa	Monoclonal de ratón	1:5000	Molecular Probes
Anti-CIII Core2	Monoclonal de ratón	1:5000	Molecular Probes
Anti- β -ATPasa	Policlonal de conejo	1:1000	Generado en el laboratorio (Pena and Garesse, 1993)
Anti-Porina	Monoclonal de ratón	1:1000	Mitosciences
Anti-HA	Monoclonal de rata	1:1000	Roche Applied Science
Anti-Flag	Monoclonal de ratón	1:1000	Stratagene

Anticuerpos secundarios

Nombre	Origen	Dilución	Procedencia
Anti-IgG ratón HRP	Policlonal de cabra	1:3000	Nordic
Anti-IgG conejo HRP	Policlonal de cabra	1:3000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-IgG rata HRP	Policlonal de cabra	1:3000	Southern Biotech
Anti-IgG ratón Alexa Fluor 488	Policlonal de cabra	1:1000	Invitrogen

2. Métodos

Las técnicas básicas de Biología Molecular se realizaron según se describe en Sambrook y colaboradores (Sambrook and Russell, 2001) o de acuerdo con los protocolos especificados en las citas correspondientes.

2.1. Clonajes

Las reacciones de PCR para el clonaje de secuencias se realizaron con la ADN polimerasa PfuTurbo (Stratagene) que presenta actividad correctora. Para la comprobación de los clonajes mediante PCR de colonias de *E. coli* y el resto de los casos se utilizó el enzima ADN polimerasa termorresistente de la casa comercial Biotools.

La purificación de bandas de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las enzimas de restricción necesarias para los clonajes se emplearon siguiendo las condiciones indicadas por cada fabricante (Invitrogen, Roche, New England Biolabs). Para las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs).

La fidelidad de todos los clones se confirmó mediante secuenciación.

2.2. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis de secuencias

La secuenciación de los distintos fragmentos de ADN se realizó utilizando el método de secuenciación automática en geles desnaturalizantes de acrilamida/bisacrilamida en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM, Madrid). El análisis de secuencias, la generación de mapas de restricción, el procesamiento de los resultados de secuenciación y los alineamientos de secuencias se realizaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3.

2.3. Aislamiento de ácidos nucleicos

Aislamiento de ARN de células en cultivo

El ARN total de células en cultivo fue obtenido utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de los ARN obtenidos se calcularon midiendo su absorbancia a 260 nm y la relación de las absorbancias a 260 nm y 280 nm respectivamente. La integridad de los ARN se comprobó mediante chips microfluídicos en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent technologies).

Aislamiento de ADN plasmídico

Para la purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* se utilizaron los kits High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) o Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche) para la obtención de pequeñas y grandes cantidades de ADN respectivamente y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.4. RT-PCR y PCR cuantitativa (qRT-PCR)

La retrotranscripción del ARNm se realizó utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de los niveles de ARNm del gen *CCDC56* humano se realizó utilizando sondas Taqman específicas para *CCDC56* y el ARNr 18S como control endógeno.

La cuantificación de los ARNm mitocondriales de COX1, COX2, COX3, ND5, CytB, ATP6 y ARNr 12S se realizó utilizando el reactivo SYBR Green (Applied Biosystems) y oligonucleótidos específicos para cada uno de estos genes y para el ARNr 18S como control endógeno.

Todos los ensayos de PCR cuantitativa se realizaron siempre por triplicado en el aparato 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y los resultados se analizaron utilizando el programa SDS 2.2.

2.5. Cultivo de líneas celulares y transfección

Las células se crecieron en DMEM (Invitrogen) con 4.5 g/l de glucosa suplementado con 10% FBS, uridina, penicilina y estreptomycin en un incubador a 37°C con 5% CO₂.

Para la transfección de células HeLa se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se plaquearon 24 horas antes de la transfección en medio completo. La lipofectamina 2000 se diluyó en medio sin suero (OptiMEM, Invitrogen), se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se mezcló con 30 nM de una mezcla de los siRNAs o 5 µg de ADN, en el caso de las construcciones, también diluidos en OptiMEM. Las muestras se incubaron durante 25 minutos a temperatura ambiente y se añadieron a las placas.

Para generar las líneas celulares estables de sobreexpresión de *CCDC56-Flag*, 48 horas después de la transfección se añadieron al medio 1.5 µg/ml de puromicina. Las células seleccionadas se crecieron siempre en presencia del antibiótico.

2.6. Curvas de crecimiento

Para la realización de curvas de crecimiento, se plaquearon 25.000 células interferidas por pocillo en placas p35 en medios con 4.5 g/l de glucosa o 0.9 g/l de galactosa como fuentes de carbono. En los tiempos indicados las células se recogieron por tripsinización y se contaron en una cámara Neubauer.

2.7. Inmunocitoquímica

Se plaquearon células HeLa que expresan *CCDC56-Flag* sobre cristales cubreobjeto y se incubaron toda la noche a 37°C. Para teñir la red mitocondrial, las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 50 nM Mitotracker Red (Molecular Probes, Invitrogen) añadido al medio de

cultivo. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído 2% en PBS, se trataron con metanol y se incubaron con el anticuerpo anti-Flag en presencia de 2% BSA. Tras varios lavados, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Carl-Zeiss.

2.8. Aislamiento de proteínas totales de células en cultivo

Para la obtención de extractos totales de proteínas, las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS 1X. Posteriormente fueron resuspendidas en el volumen adecuado (100-200 μ L) de tampón RIPA (1% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8) al que se habían añadido previamente inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Tras 15 minutos en hielo, se centrifugaron a 16000g durante 3 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.9. Purificación de mitocondrias

La purificación de mitocondrias se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Fernández-Vizarra y colaboradores (Fernandez-Vizarra et al., 2002).

2.10. Fraccionamiento submitocondrial

Para el fraccionamiento submitocondrial, la fracción mitocondrial fue resuspendida en tampón 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.32 M sacarosa y 1 mM EDTA y se rompieron mediante sonicación. Las fracciones soluble y de membrana se separaron mediante centrifugación a 24000g durante 10 minutos a 4°C. El pellet de membrana fue resuspendido en el mismo tampón al que se le había añadido 0.1 M Na_2CO_3 , se incubó durante 30 minutos a 4°C y fue centrifugado de nuevo a 24000g durante 10 minutos a 4°C para separar las proteínas integrales de membrana de las que se encuentran asociadas a ella de manera extrínseca.

2.11. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western Blot)

Entre 50 y 100 μ g de proteínas de cada extracto total o fracción mitocondrial purificada se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10% o al 12% y posteriormente fueron transferidos a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se incubaron toda la noche en solución de bloqueo (1X TBS pH 7.4, 0.1% Tween 20, 5% leche desnatada en polvo) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en las condiciones de dilución establecidas para cada uno de ellos (Detalladas en la sección 1.8). Las membranas se lavaron tres veces con 1X TBS pH 7.4, 0.1% Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado en solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces

con 1X TBS pH 7.4, 0.1% Tween 20. Como reactivos de revelado se utilizaron los kits ECL y ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (Amersham).

2.12. Determinación de actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

Todas las medidas se realizaron en extractos enriquecidos en mitocondria obtenidos mediante el tratamiento con digitonina de las células. 5×10^6 células resuspendidas en tampón MOPS 20 mM y sacarosa 0.25 M, se incubaron con digitonina 0.2 mg/ml durante 5 minutos en hielo y se centrifugaron a 10000g durante 3 minutos a 4°C. Los pellet mitocondriales se resuspendieron en tampón fosfato 10 mM pH 7 y se lisaron mediante sonicación (2 ciclos de 15 segundos a una amplitud de 15 micrones). La cantidad de proteínas presentes en el extracto se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

La actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial fue determinada mediante espectrofotometría, en un espectrofotómetro Beckman DU800, según técnicas descritas previamente (Tiranti et al., 1995) con ligeras modificaciones.

La actividad del complejo I (NADH deshidrogenasa) se determinó midiendo la oxidación del NADH a 340 nm. El medio de reacción contenía 20 mM tampón fosfato pH 8, 0.2 mM NADH, 1 mM NaN_3 , 0.1% BSA-EDTA y 200 μM CoQ. La reacción fue inhibida al 90% tras añadir 5 μM rotenona.

La actividad del complejo II (succinato deshidrogenasa) se determinó monitorizando la reducción del aceptor artificial de electrones 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) a 600 nm. El medio de reacción contenía: 32 mM Succinato, 50 mM tampón fosfato pH 7, 1.5 mM KCN, 50 μM CoQ_1 y 0.1 mM DCPIP.

Para la valoración de la actividad del complejo III (ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa) se midió la aparición de citocromo *c* reducido a 550 nm, en una mezcla de reacción que contenía 50 mM tampón fosfato pH 7.5, 2 mM NaN_3 , 0.1% BSA-EDTA, 1 mM citocromo *c* y 50 μM decilubiquinol (DBH_2).

La actividad del complejo IV (citocromo *c* oxidasa) se determinó midiendo la oxidación del citocromo *c* reducido a 550 nm en una solución 10 mM tampón fosfato pH 7 y 80 μM citocromo *c* reducido.

Todas las reacciones se llevaron a cabo a 30°C excepto la del complejo IV que se incubó a 38°C. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas de cada extracto.

2.13. Medida de la actividad citrato sintasa

La actividad de este enzima se cuantificó en función del cambio en la absorbancia del DTNB (ácido 5-5' ditio bis 2-nitrobenzoico) a 412 nm producido por su reacción con el coenzima

A libre formado en la reacción catalizada por la citrato sintasa. La reacción se llevó a cabo en un espectrofotómetro Beckman DU800 a 30°C en un tampón que contiene acetil-CoA 350 µg/ml, 0.5 mM oxalacetato, 100 µM DTNB, 75 mM Tris-HCl pH 8 y 0.1% Tritón X-100. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas del extracto celular.

2.14. Marcaje *in vivo* de proteínas mitocondriales

Siguiendo el protocolo descrito por A. Chomyn (Chomyn, 1996), se marcaron 300.000 células con 200 µCi/ml de L-[³⁵S]-metionina (Perkin Elmer) durante 30, 60 o 90 minutos en 1 ml de medio DMEM sin metionina (Invitrogen) suplementado con 100 µg/ml de emetina para los experimentos de pulso o 100 µg/ml de anisomicina para los experimentos de pulso y caza. Después de la incubación, las células se lavaron y tripsinizaron para los experimentos de pulso o se incubaron en medio completo durante los tiempos de caza estimados.

100 µg de cada extracto total de proteínas se cargaron en geles de poliacrilamida con un gradiente del 15% al 20%. Las proteínas mitocondriales marcadas se visualizaron mediante autorradiografía directa de los geles o se cuantificaron utilizando un Typhoon Trio phosphorimager system (GE Healthcare).

2.15. Electroforesis en condiciones nativas (*“Blue Native”*PAGE) y ensayos de actividad en gel (IGA)

La electroforesis en condiciones nativas y los ensayos de actividad en gel se realizaron siguiendo el método descrito por L. Nitjmans (Calvaruso et al., 2008). Los extractos de proteínas mitocondriales se obtuvieron mediante el tratamiento de las células con digitonina 2 mg/ml seguido de la solubilización de los complejos de la membrana con 2% n-dodecil β-D-maltósido (laurilmaltósido). 40 µg de cada extracto fueron separados en geles nativos de poliacrilamida con un gradiente del 4 al 15%. Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF e incubadas con los anticuerpos correspondientes.

Para los ensayos de actividad en gel del complejo I, tras la electroforesis los geles se incubaron 1-2 horas a 37°C en 2 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mg/ml NADH y 2.5 mg/ml NTB (azul de nitrotetrazolio). Los ensayos de actividad en gel del complejo IV se realizaron incubando los geles 24 horas a 37°C en 50 mM fosfato sódico pH 7.2, 0.5 mg/ml 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2 mg/ml citocromo *c* y 20 µg/ml de catalasa. Tras la tinción los geles fueron lavados con agua destilada y escaneados.

Para los ensayos de cinética de formación de los complejos se trataron las células con 5 µg/ml de cloranfenicol durante dos días y tras la transfección de los siRNAs se retiró el antibiótico. Se crecieron las células en medio completo y se recogieron a las 8, 24, 48 y 72 horas de retirada del cloranfenicol. Los experimentos de BN-PAGE se llevaron a cabo como se ha detallado anteriormente.

2.16. Geles bidimensionales (2D BN/SDS-PAGE)

Para los experimentos de 2D BN/SDS-PAGE las células interferidas fueron retransfectadas con los siRNAs y el control Ki #2 respectivamente a las 48 horas de la primera transfección para obtener mayores niveles de interferencia. Los geles bidimensionales se realizaron siguiendo el método descrito por L. Nitjmans (Calvaruso et al., 2008). Tras separar las muestras en un gel de “*Blue Native*” con un gradiente del 4 al 18% de acrilamida, los carriles del gel fueron cortados e incubados en 1% SDS y 1% β -mercaptoetanol durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% y transferidos a membranas de PVDF para ser incubados con los anticuerpos correspondientes.

2.17. Generación de anticuerpos policlonales frente a la proteína CCDC56

El ADNc que codifica CCDC56 humano se clonó de manera dirigida en fase con la región codificante de 6xHis que contiene el vector pRSET B (Invitrogen). La expresión de la proteína de fusión se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21 CodonPlus crecida en medio LB con ampicilina (200 μ g/ml) y cloranfenicol (30 μ g/ml). Para inducir la expresión de CCDC56 se añadió al medio de cultivo 1 mM IPTG (Isopropil- β -D-1-galactopiranosido) y se incubaron las bacterias durante 4 horas a 37°C en agitación. Los cultivos de bacterias se recogieron centrifugando a 5000g durante 5 minutos, se resuspendieron en PBS con lisozima y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se lisaron mediante sonicación (8 ciclos de 15 segundos a una amplitud de 20-25 micras). El lisado se centrifugó durante 4 minutos a 300g a 4°C, se recogieron los sobrenadantes, y éstos se centrifugaron durante 15 minutos a 16000g a 4°C. Los sedimentos obtenidos se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE al 10%, que se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (1 g/l) en etanol 20% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) durante al menos una hora. Las bandas correspondientes a la proteína se recortaron, se emulsionaron mediante sonicación con un volumen de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) y fueron inoculadas por vía subcutánea en conejos *New Zealand*. Se inocularon con intervalos de 2 semanas otras tres dosis emulsionadas con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) por vía intramuscular seguidas de una última inoculación subcutánea. Previamente a cada una de las inoculaciones se extrajo sangre al conejo con objeto de analizar la respuesta inmune a lo largo del tiempo.

2.18. Inmunoprecipitación de CCDC56-Flag

La inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Flag se llevó a cabo utilizando FLAG Immunoprecipitation Kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Las mitocondrias de la línea que sobreexpresa CCDC56-Flag se lisaron con 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.5% laurilmaltósido. Este lisado se incubó a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo anti-Flag unido a una resina de agarosa, se lavó tres veces con 50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl para eliminar las proteínas no unidas al anticuerpo y

se eluyó CCDC56-Flag utilizando 150 ng/ μ l de péptido Flag.

2.19. Análisis estadístico de los resultados

Cada experimento se realizó al menos por triplicado. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con los programas Excel (Microsoft) y GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). Se utilizaron el test ANOVA y el post-test de Bonferroni para determinar la significación estadística de las diferencias obtenidas en los resultados de cada experimento.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CCDC56

Durante los últimos 20 años, *Drosophila melanogaster* ha demostrado ser un buen sistema modelo para la caracterización de genes mitocondriales homólogos a genes humanos, entre los que se incluyen genes implicados en el correcto desarrollo de la biogénesis mitocondrial como *Pol γ - β* , *mtSSB* o *mtTFB2* (Garesse and Kaguni, 2005). Durante la caracterización funcional del factor de traducción mitocondrial mtTFB1, identificamos la presencia de una pauta abierta de lectura en el primer exón de su ARNm, en lo que se consideraba como la región 5'UTR del mensajero. Esta nueva ORF codifica una proteína de 87 aminoácidos, denominada CCDC56, de función desconocida y con un posible destino mitocondrial.

De las más de 1500 proteínas que constituyen el proteoma mitocondrial, aproximadamente la mitad no han sido aún identificadas mediante evidencias experimentales (Pagliarini et al., 2008), lo cual unido al potencial destino mitocondrial de CCDC56, nos llevó a tratar de estudiar su posible implicación en la función de este orgánulo.

1. Falta de función de *CCDC56* en *Drosophila melanogaster*

Como primera aproximación a la caracterización funcional de *CCDC56*, procedimos a estudiar el fenotipo que producía su falta de función en *Drosophila*. Para ello, en un trabajo del laboratorio previo a esta tesis, se generaron dos líneas “*knock-out*” para *CCDC56* en *D. melanogaster* ((Peralta et al., 2012), enviado a publicar).

Ambas líneas se generaron mediante la movilización de un elemento P insertado en la región promotora del bicistrón *CCDC56/mtTFB1*. Al introducir transposasa en este fondo genético, se induce la movilización del elemento P, el cual puede llevarse consigo ADN de las regiones flanqueantes generando deleciones. Así se obtuvieron dos líneas, *CCDC56*^{D6} y *CCDC56*^{D11}, en que se habían eliminado dos regiones de 570 y 1168 pb respectivamente. La deleción de la línea *CCDC56*^{D6} (D6) incluye parte del promotor y de la región 5' de *CCDC56*, hasta 23 nucleótidos por debajo de su codón ATG de inicio de la traducción. En la línea *CCDC56*^{D11} (D11), la deleción ha eliminado una amplia región del promotor así como la ORF completa de *CCDC56*, sin afectar a *mtTFB1* (Figura 7).

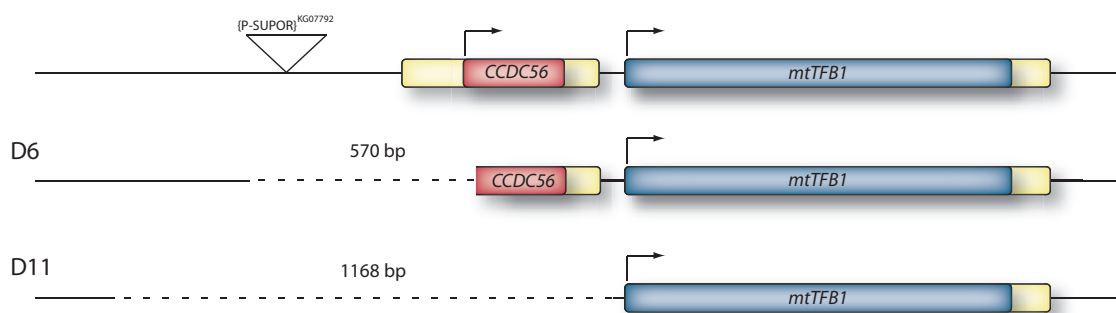


Figura 7. Esquema de las deleciones generadas en *CCDC56*. El triángulo muestra la región genómica con el punto de inserción del elemento P (P-SUPOR^{KG07792}) posteriormente movilizado. La escisión de este elemento P generó dos líneas portadoras de deleciones, D6 y D11, esquematizadas en la figura. La deleción de la línea D6, de 570 pb, afecta a parte del promotor y de la región 5' de *CCDC56*, incluyendo su codón de inicio de la traducción. La deleción de la línea D11 de 1168 pb elimina una región más amplia del promotor así como la ORF completa de *CCDC56*. Ninguna de las deleciones afecta a la ORF de *mtTFB1*.

Ambas deleciones en homocigosis producen letalidad en el tercer estadio larvario, demostrando que *CCDC56* es esencial para el desarrollo de *Drosophila*. Las larvas KO para *CCDC56* son de menor tamaño que los controles, permanecen en estado de larva durante más de 20 días, frente a los 14 días de los controles, y presentan un defecto de proliferación celular y un aumento de apoptosis en sus discos imaginales de ala (Figura 8), siendo éste un fenotipo típico de otros mutantes con una severa disfunción mitocondrial en *Drosophila* (Maier et al., 2001, Adan et al., 2008).

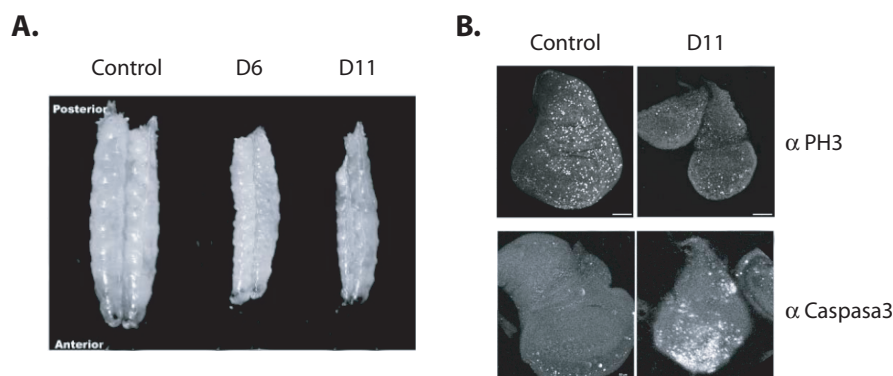


Figura 8. Fenotipo de las líneas “knock-out” para *CCDC56*. **A)** Comparación del tamaño de las larvas de tercer estadio de las líneas control y portadoras de las deleciones (D6 y D11). **B)** Inmunohistoquímica de los discos imaginales de ala de las líneas control y D11. Los anticuerpos contra Caspasa 3 y Fosfohistona 3 (PH3) mostraron un aumento de la apoptosis y una disminución de la proliferación celular, respectivamente, en las líneas portadoras de la deleción 11.

Por tanto, para comprobar la relación de *CCDC56* con la función mitocondrial, se midió la actividad de los complejos de la cadena respiratoria en las larvas de tercer estadio. Estas medidas revelaron que, en ausencia de *CCDC56*, las larvas presentan un grave defecto de la actividad del complejo IV, mientras que las actividades de los complejos I, II y III, así como la actividad de la citrato sintasa se encuentran ligeramente elevadas con respecto a los controles (Figura 9A). Este defecto en la actividad del complejo IV correlaciona con una drástica caída en los niveles de complejo IV totalmente ensamblado analizados mediante geles bidimensionales BN/SDS-PAGE (Figura 9B).

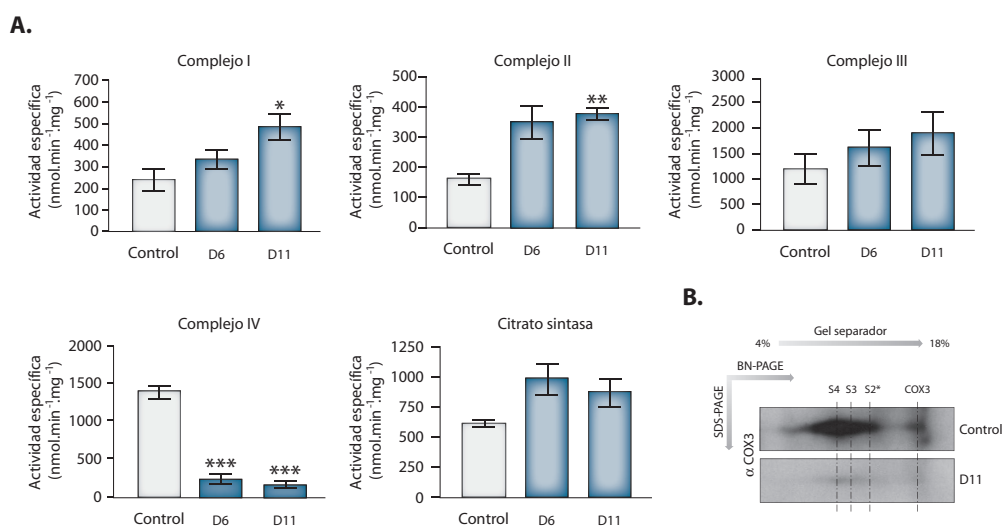


Figura 9. Caracterización bioquímica de las líneas “knock-out” de *CCDC56*. **A)** Medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y del enzima citrato sintasa en larvas de las líneas control y portadoras de las deleciones D6 y D11. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. **B)** 2D BN/SDS-PAGE de la línea control y la línea portadora de la deleción 11. La hibridación con anticuerpos anti-COX3 mostró una disminución de la cantidad de complejo IV totalmente ensamblado (S4) y de sus subcomplejos.

Puesto que en las líneas KO la delección ha eliminado parte del promotor de *CCDC56/mtTFB1*, procedimos a valorar la posible pérdida de su capacidad transcripcional, cuantificando los niveles del ARNm de *mtTFB1* mediante qPCR. A pesar de no encontrarse afectada la región codificante de *mtTFB1*, los niveles de este mensajero se encontraban muy reducidos en ambas líneas (Figura 10A). Para comprobar si el fenotipo de los animales era debido a la falta de función de *CCDC56* o a la disminución en la expresión de *mtTFB1*, se sobreexpresaron ambos genes en las líneas delecionadas utilizando el sistema UAS-GAL4 de levadura. El defecto de la actividad de COX podía ser rescatado parcialmente mediante la sobreexpresión del ADNc de *CCDC56*, mientras que la sobreexpresión de *mtTFB1* no tenía ningún efecto en la misma (Figura 10B).

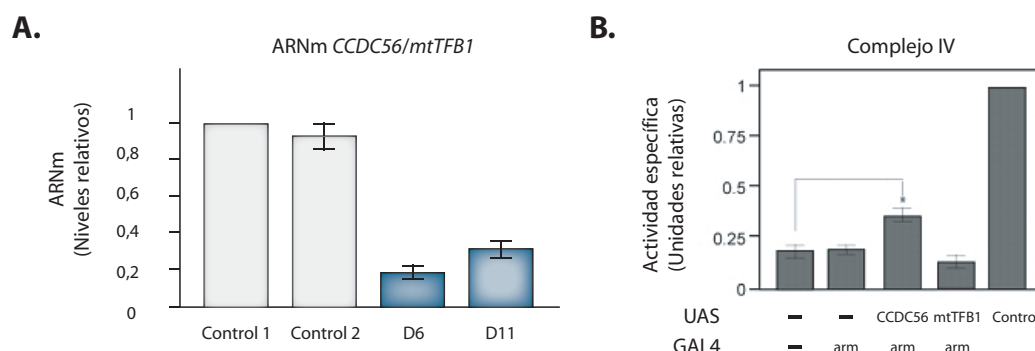


Figura 10. Rescate de la actividad del complejo IV en las larvas “knock-out”. **A)** Niveles del ARNm de *CCDC56/mtTFB1* en larvas control y KO para *CCDC56* (D6 y D11). Los niveles de ARNm se detectaron mediante RT-PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems) específicas y se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. **B)** Rescate de la actividad del complejo IV mediante la sobreexpresión de *CCDC56* y *mtTFB1*. Se introdujo en la línea portadora de la delección 11 una copia de *CCDC56* o de *mtTFB1* bajo el control de secuencias UAS y se indujo su expresión utilizando el transactivador armadillo-GAL4 (arm-GAL4). Se muestra la actividad específica del complejo IV en la línea D11, en la línea D11/arm-GAL4, en la línea que sobreexpresa *CCDC56*, la línea que sobreexpresa *mtTFB1* y en la línea control. El grado de significación estadística se muestra como * $p < 0.05$.

Estos resultados apoyan que la ausencia de *CCDC56* en estas líneas es la responsable de la caída del complejo IV. Sin embargo, no se puede descartar completamente que *mtTFB1* esté interviniendo en el fenotipo de estas líneas ya que la sobreexpresión de *CCDC56* no es capaz de rescatar la actividad de COX hasta el nivel de los controles.

2. *CCDC56* se encuentra conservada en humanos

Debido a la relevancia que *CCDC56* parece tener en la actividad del complejo IV, procedimos a realizar un rastreo de las bases de datos que nos permitiera identificar la presencia de este gen en humanos (NCBI Blast: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los análisis comparativos mostraron que esta proteína se encuentra muy conservada en metazoos desde *D. melanogaster* hasta

humanos y que, excepto en insectos, el gen *CCDC56* se encuentra en una localización genómica distinta al gen *mtTFB1* codificado por su propio ARNm (Figura 11). Asimismo, estos análisis nos mostraron que *CCDC56* se encuentra ausente en bacterias, hongos, plantas o eucariotas inferiores como *Saccharomyces cerevisiae*.

		10	20	30	40	50		
H.sapiens	:	MASSGAGDPLDSKRGE	APFAQRIDPTREK	LTPEQLHSMRQAE	LACWQKVL	P--RR	:	53
B.taurus	:	MATPGPGDPVDAKSGK	APLAQRIDPTREK	LTPAQLQEMRQAQL	ACWQKTL	P--QR	:	53
M.musculus	:	MAAPGAGDPLNAKNGN	APFAQRIDPSREK	LTPAQLQEMRQVQL	ACWQKTL	P--QR	:	53
G.gallus	:	MAAPRE-----	PVGEAAFAARRID	PEREPGLSPEORRE	MAQVERAQR	QRALQR-QL	:	49
X.laavis	:	MAEKGS-----	PKESA-KYAQRID	PKRET-LSPEQQE	EMRKTEMAQ	WRNAG--KL	:	48
D.renio	:	MADKSS---QGE	PKPEAQEAKRID	PTKEA-LTKEQLQEI	RQVEMAQWR	KKTD--KL	:	50
D.melanogaster	:	MSASEQ-----	GPKIKYGE	SA-PKLDK----	ACLQEMRLIE	EQNLDRVQK	LKRI	: 44

		60	70	80	90	100	110	
H.sapiens	:	RTRNIVTGLGIGALV	IAIYGTYFYSIS	QERFLDELE	DEAKAARARAL	AR--ASGS	:	106
B.taurus	:	RTRNIVTGLGIGALV	IAIYGTYFYSVS	QERFLDELE	DEAKAARARAL	ER--ASGH	:	106
M.musculus	:	RTRNIVTGLGIGALV	IAIYGTYFSVA	QERFLDELE	DEAKAARARAL	ERERASGP	:	108
G.gallus	:	RSRNVLLALGIGV	TAGIYGTYFYSVS	QEQLDELE	QEAEARARAW	ERQKSAAS	:	104
X.laavis	:	RGRNLVTGLVIGG	IVIGIYGTYFYS	VAQEKFLDELE	VDAKAAARS	YPKT---SAN	:	100
D.renio	:	RGRNVATGLATG	AVVIGIYGTYFYS	VSQEKIMDEI	DEEAKVRVP	KTGAN-----	:	99
D.melanogaster	:	RRNLLTAGALG	VSVIAIYGYSIF	SVQQEKFLDDF	EPKRVSS-----	:	87	

Figura 11. Comparación de la secuencia de aminoácidos de CCDC56 de diferentes organismos.

Los residuos conservados en todas las especies están indicados en color azul oscuro. En tonos azul claro se representan los residuos con un menor grado de similitud. En blanco se indican los residuos no conservados.

El gen *CCDC56* humano se encuentra localizado en el brazo largo de cromosoma 17 (17q21.31) y codifica una proteína de 106 aminoácidos y 11.7 KDa. Las bases de datos le asignan a esta proteína una localización mitocondrial y dos dominios, un dominio transmembrana entre los aminoácidos 58 a 78 y un dominio “Coiled-Coil”, de interacción proteína-proteína, entre los aminoácidos 78 a 104 (Figura 12).

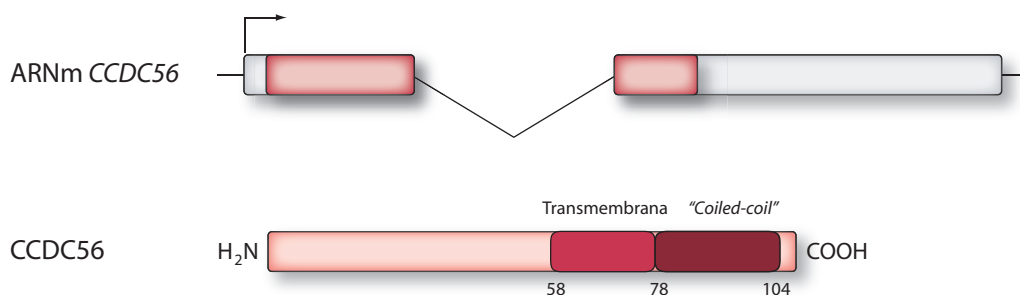


Figura 12. Representación esquemática del ARNm y la proteína CCDC56 humanos. El ARNm de *CCDC56* tiene un tamaño de 752 pb y está formado por dos exones. En él se muestra en rojo la región codificante y en gris las regiones no traducidas. La proteína *CCDC56* está formada por 106 aminoácidos, mostrándose en rojo oscuro los dos dominios asignados a esta proteína por las bases de datos, un dominio transmembrana entre los aminoácidos 58 y 78 y un dominio “Coiled-Coil” entre los aminoácidos 78 y 104.

3. Caracterización funcional de CCDC56 en líneas celulares humanas.

Puesto que CCDC56 se encuentra presente en humanos y está codificada en un mensajero monocistrónico, proseguimos la caracterización funcional de esta proteína en la línea celular humana HeLa, derivada de un carcinoma cervical.

3.1. Generación de anticuerpos policlonales contra la proteína CCDC56 humana

Una importante herramienta para la caracterización funcional de nuevas proteínas es la disponibilidad de anticuerpos contra ellas que nos permitan su detección y la evaluación de sus niveles en las distintas condiciones experimentales y fisiológicas. Por esta razón, se diseñó una estrategia para la generación de anticuerpos policlonales de conejo que reconocieran la proteína CCDC56 humana.

En primer lugar se clonó el gen *CCDC56* en el vector pRSET B, que permite la sobreexpresión de la proteína en *E. coli*. La construcción se transformó en la cepa BL21 Codon Plus y se indujo la expresión de CCDC56 con IPTG. Mediante sonicación y centrifugación se separaron las fracciones soluble e insoluble del cultivo bacteriano y comprobamos que CCDC56 aparecía mayoritariamente formando parte de cuerpos de inclusión (Figura 13A). Esta fracción insoluble del cultivo se separó en geles de acrilamida y se recortó la banda correspondiente a CCDC56, la cual fue utilizada para inmunizar los conejos (Figura 13B).

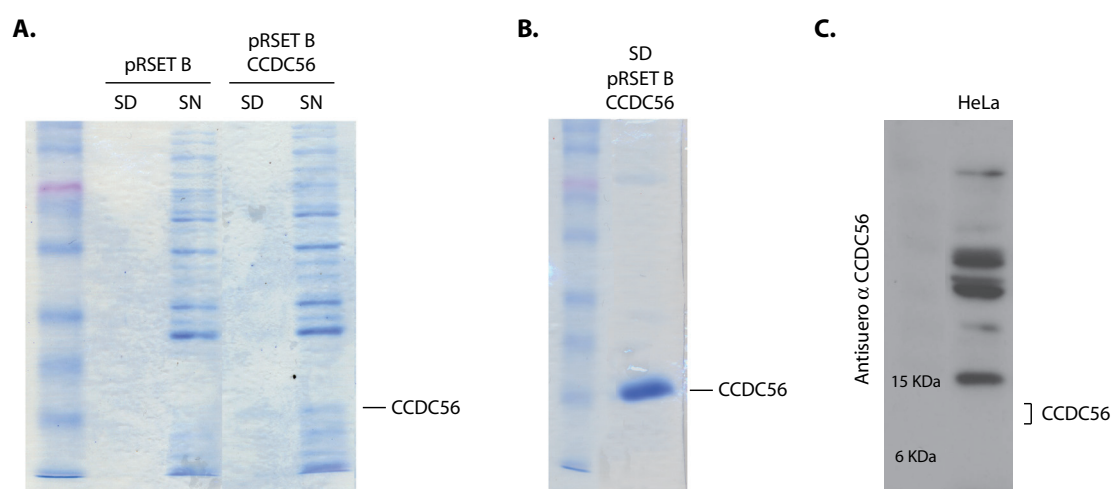


Figura 13. Sobreexpresión de CCDC56 en *E. coli* y análisis de los anticuerpos policlonales obtenidos.

A) Extractos totales de proteína de bacterias *E. coli* de la cepa BL21 tras la inducción de la sobreexpresión de *CCDC56* con 1mM IPTG. Mediante sonicación y centrifugación se separaron las fracciones soluble (sobrenadante, SN) e insoluble del cultivo (sedimento, SD). **B)** Fracción insoluble del cultivo de BL21. La proteína CCDC56 se recortó e inyectó en conejos para la generación de anticuerpos. **C)** Western Blot en un extracto de proteína total de células HeLa utilizando el antisuero anti-CCDC56 obtenido tras la inoculación.

Tras varias inoculaciones de CCDC56, se obtuvo el suero de los conejos inmunizados y se procedió a ensayar mediante Western Blot la afinidad y especificidad de los anticuerpos generados. Desafortunadamente, no pudimos detectar ninguna proteína del tamaño esperado para CCDC56 en ninguna de las condiciones experimentales analizadas al utilizar estos sueros sobre un extracto de células HeLa (Figura 13C).

3.2. Generación de líneas estables de sobreexpresión y localización subcelular de CCDC56

El primer paso en la caracterización funcional de CCDC56 fue comprobar si esta proteína se localiza en mitocondria como así se le asigna en las bases de datos. Puesto que los antisueros obtenidos previamente contra CCDC56 no eran capaces de reconocer la proteína endógena, generamos dos versiones de *CCDC56* en las que fusionamos su ADNc a una cola HA en su extremo amino terminal o a una cola Flag en su extremo carboxilo terminal que nos permitirían el reconocimiento de la proteína mediante anticuerpos específicos contra el fragmento fusionado (Figura 14).



Figura 14. Representación esquemática de las construcciones generadas para la sobreexpresión de CCDC56. Se fusionaron una cola de HA (Rosa) al extremo amino de la proteína o una cola Flag (Verde) a su extremo carboxilo para generar las construcciones HA-CCDC56 y CCDC56-Flag respectivamente.

Estas dos construcciones se clonaron en el vector de expresión eucariota pIRESpuro2 y se transfectaron en células HeLa. Mediante la selección con el antibiótico puromicina, se obtuvieron dos líneas celulares que sobreexpresaban de manera estable y constitutiva las proteínas HA-CCDC56 y CCDC56-Flag respectivamente, así como una línea celular control en la que se había transfectado el vector pIRESpuro2.

El análisis mediante Western Blot reveló que ambas proteínas se expresaban correctamente en las líneas generadas, utilizando para ello anticuerpos que reconocen los epítomos HA y Flag. Como se muestra en el panel superior de la figura 15, ambas líneas expresan la versión correspondiente de CCDC56, mientras que no se observa ninguna señal en las células transfectadas con el vector pIRESpuro2. Curiosamente, el tamaño de la proteína HA-CCDC56 es ligeramente superior al de CCDC56-Flag, a pesar de que HA y Flag tienen tamaños similares (HA: YPYDVPDYA, Flag: DYKDDDDK).

Con objeto de confirmar estos resultados y para comprobar si el antisuero previamente obtenido era capaz de reconocer la proteína sobreexpresada, realizamos un experimento similar utilizando los antisueros contra CCDC56. Como se muestra en la figura 15, pudimos comprobar

que, pese a no detectar la proteína CCDC56 endógena, estos antisueros sí eran capaces de hacerlo cuando se encuentra sobreexpresada. Además, contrariamente a los resultados obtenidos con anti-HA y anti-Flag, el tamaño de la proteína HA-CCDC56 detectada es inferior al de CCDC56-Flag (Figura 15, panel inferior).

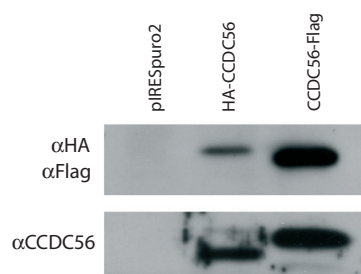


Figura 15. Sobreexpresión de HA-CCDC56 y CCDC56-Flag en células HeLa. En la figura se muestra el Western Blot con anticuerpos anti-HA, anti-Flag (panel superior) y anti-CCDC56 (panel inferior) de las líneas que contienen pIRESpuo2, y las construcciones HA-CCDC56 y CCDC56-Flag sobre el mismo vector.

Estos resultados se explican si tenemos en cuenta el procesamiento de la presecuencia de localización mitocondrial de CCDC56 cuando ésta es importada a la mitocondria. Así, la proteína CCDC56-Flag es procesada normalmente y es detectada tanto por los anticuerpos anti-Flag como por los anticuerpos anti-CCDC56. Sin embargo, la cola de HA en el extremo amino terminal de la proteína podría interferir con el procesamiento de su presecuencia mitocondrial haciendo que en estas células existan dos formas distintas de CCDC56, una forma procesada y otra de mayor tamaño sin procesar. Con los anticuerpos anti-HA se detecta la forma completa de HA-CCDC56, de mayor tamaño ya que no ha sido procesada. Por otro lado, los anticuerpos contra CCDC56 detectan la proteína madura en la que el procesamiento de la presecuencia ha eliminado la cola de HA, dando como resultado una proteína CCDC56 igual a la proteína endógena. Este antisuero anti-CCDC56 también se une a la forma completa de HA-CCDC56, aunque ésta es minoritaria (Figura 16).

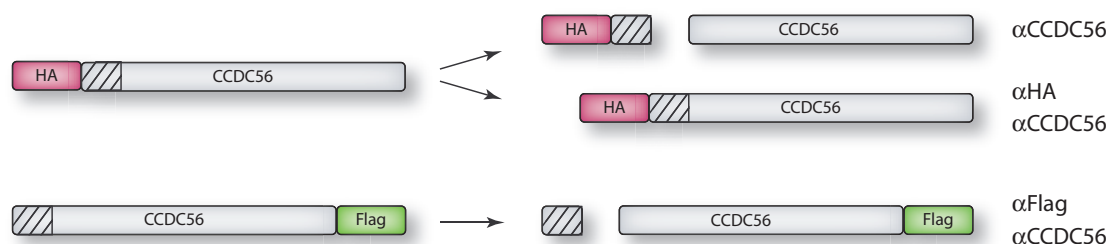


Figura 16. Representación esquemática del procesamiento de la presecuencia de HA-CCDC56 y CCDC56-Flag. CCDC56 está representado en gris con su presecuencia rayada. Las colas HA y Flag están representados en rosa y verde respectivamente. Una parte de la proteína HA-CCDC56 no es procesada y es detectada por anticuerpos anti-HA y el antisuero anti-CCDC56. La proteína HA-CCDC56 procesada únicamente es detectada con el antisuero anti-CCDC56. La presecuencia de CCDC56-Flag es procesada normalmente y la proteína resultante es detectada tanto por anti-Flag como por el antisuero anti-CCDC56.

Puesto que en la línea que expresa HA-CCDC56 coexisten dos formas distintas de CCDC56, continuamos los experimentos únicamente con la línea que expresa CCDC56-Flag, que probablemente nos permitirá una interpretación más clara de los resultados.

Seguidamente, procedimos a analizar la localización subcelular de CCDC56-Flag mediante inmunocitoquímica con anticuerpos anti-Flag. Como marcador de la red mitocondrial se utilizó el colorante fluorescente Mitotracker Red (Invitrogen), dependiente de potencial de membrana. Como muestra la superposición de imágenes de microscopía confocal (Figura 17), la señal de CCDC56-Flag colocaliza totalmente con la señal del Mitotracker, confirmando que la proteína CCDC56 se encuentra localizada en mitocondria.

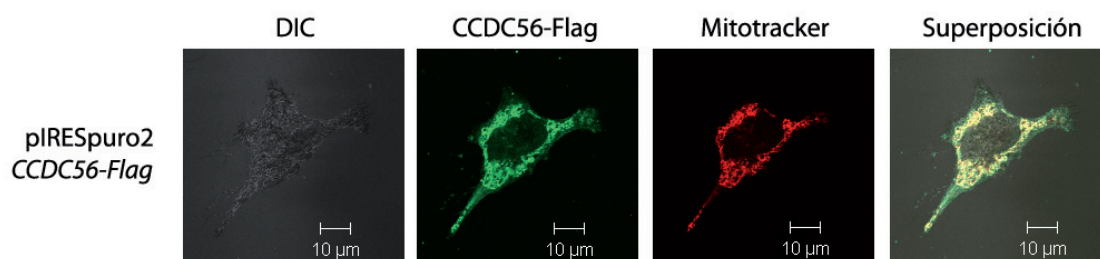


Figura 17. Localización subcelular de CCDC56-Flag. Inmunocitoquímica de la línea CCDC56-Flag. La imagen de las células se tomó con microscopía óptica de contraste interferencial o Nomarski (DIC). CCDC56-Flag se detectó utilizando anticuerpos anti-Flag. La distribución mitocondrial de las células se analizó mediante incubación con el marcador específico mitocondrial Mitotracker Red (Invitrogen). Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Carl Zeiss.

La purificación de mitocondrias de la línea que sobreexpresa CCDC56-Flag y su posterior subfraccionamiento nos permitieron estudiar con precisión en qué compartimento mitocondrial se encuentra localizada esta proteína. En primer lugar, la ruptura mediante sonicación y centrifugación de estas mitocondrias permite separar las fracciones soluble y de membrana. A su vez, el tratamiento de la fracción de membrana con carbonato de sodio facilita la separación de las proteínas que se encuentran asociadas a la membrana de forma extrínseca de aquellas proteínas integrales de la membrana mitocondrial. Como muestran los resultados en la figura 18, la MnSOD mitocondrial, una proteína de la matriz, aparece en la fracción de las proteínas solubles. CCDC56-Flag, sin embargo, se encuentra localizada en la fracción correspondiente a las proteínas integrales de membrana, junto con porina o COX1. Estos resultados confirman la predicción de las bases de datos, que indican que CCDC56 es una proteína integral de la membrana mitocondrial interaccionando con ésta a través de un dominio transmembrana entre los aminoácidos 58 y 78.

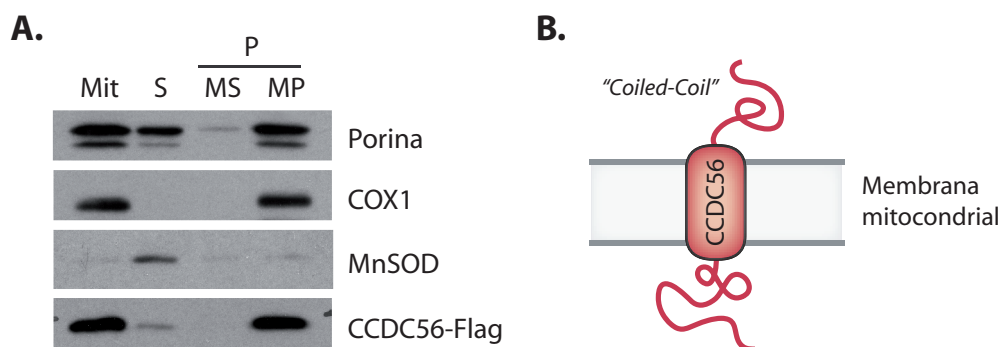


Figura 18. Localización submitocondrial de CCDC56-Flag. **A)** Fraccionamiento de mitocondrias de la línea que sobreexpresa CCDC56-Flag. Mit: extracto mitocondrial total. S: Fracción de proteínas solubles. P: Fracción de membrana. MS: Fracción de proteínas asociadas a la membrana mitocondrial de forma extrínseca. MP: Fracción de proteínas integrales de la membrana mitocondrial. **B)** Representación esquemática de la disposición de CCDC56 en la membrana mitocondrial.

3.3. Interferencia de *CCDC56* en células HeLa

Una vez demostrada la localización mitocondrial de CCDC56 y con objeto de estudiar la función que desempeña esta proteína dentro de la mitocondria de humanos, se diseñó un experimento para silenciar su expresión mediante técnicas de interferencia de ARN. Ésta es una potente estrategia experimental que induce la degradación del ARNm de interés en el citoplasma celular mediante el empleo de pequeñas moléculas de ARN de doble cadena que hibridan con el mismo.

Transfección transitoria de siRNAs en células HeLa y silenciamiento de CCDC56

Para silenciar la expresión de *CCDC56*, transfectamos células HeLa de manera transitoria con una mezcla de 3 siRNAs (*“small interfering RNAs”*, Applied Biosystems) dirigidos contra la región 3'UTR de su ARNm (Figura 19A). Mediante RT-PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman se analizaron los niveles de ARNm de *CCDC56* tras la transfección. Con esta estrategia de silenciamiento obtenemos una interferencia máxima de alrededor del 90% a las 24 horas de la transfección. Desde este momento los niveles del mensajero de *CCDC56* van aumentando lentamente hasta alcanzar aproximadamente el 30% a las 96 horas de la transfección. Como controles se han utilizado la línea HeLa sin transfectar y células HeLa transfectadas con un siRNA cuya secuencia no es complementaria a la de ningún ARNm humano (Ki #2, Applied Biosystems) (Figura 19B).

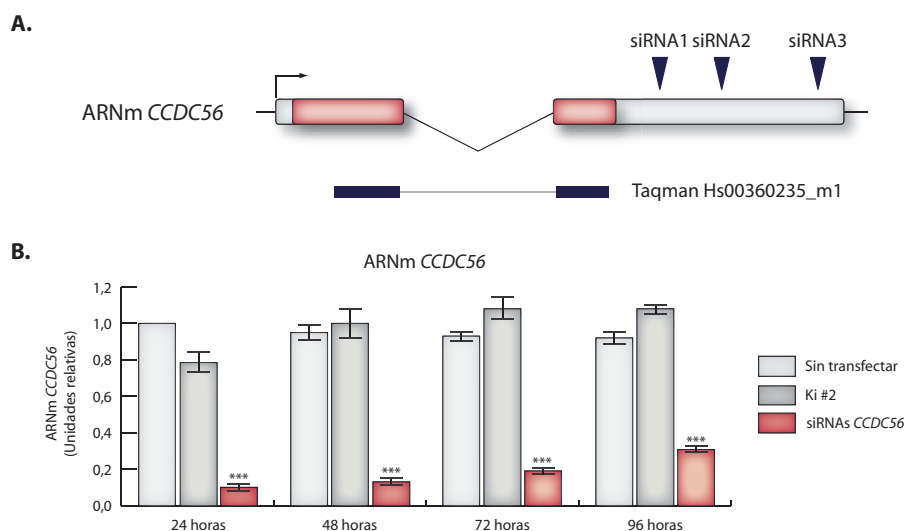


Figura 19. Interferencia transitoria de *CCDC56* en células HeLa. A) Representación esquemática del ARNm de *CCDC56*. Los triángulos representan la localización de las zonas de homología con los siRNAs. En azul se representa la región del ARNm detectada mediante el ensayo Taqman (Applied Biosystems). **B)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* tras la interferencia en células HeLa. Los niveles de ARNm de *CCDC56* se cuantificaron a las 24, 48, 72 y 96 horas de interferencia mediante RT-PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman específicas y se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$.

Curvas de crecimiento

La mayor parte del ATP celular se produce en el interior de la mitocondria gracias a la fosforilación oxidativa mediante la oxidación de los cofactores reducidos procedentes del metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. La galactosa entra en el proceso de glucólisis transformándose sucesivamente a galactosa-1-fosfato y fructosa-1-fosfato. Esta conversión de la galactosa no es muy eficiente, por lo que el suministro de ATP procedente de la glucólisis a partir de galactosa es insuficiente para satisfacer la demanda de energía de las células en ausencia de un sistema OXPHOS funcional. Así, para comprobar si la interferencia de *CCDC56* causaba algún defecto en el sistema OXPHOS y, por lo tanto, en la producción de ATP, realizamos curvas de crecimiento en presencia de 4.5 g/l de glucosa o 0.9 g/l de galactosa como fuentes de carbono.

Como se puede observar en la figura 20, las células con bajos niveles de *CCDC56*, si bien son capaces de crecer en medio con glucosa, lo hacen más lentamente que los controles. Asimismo, estas células presentan un severo defecto de crecimiento cuando se les suministra galactosa como fuente de carbono, indicando que la ausencia de *CCDC56* está causando un defecto de la producción de ATP.

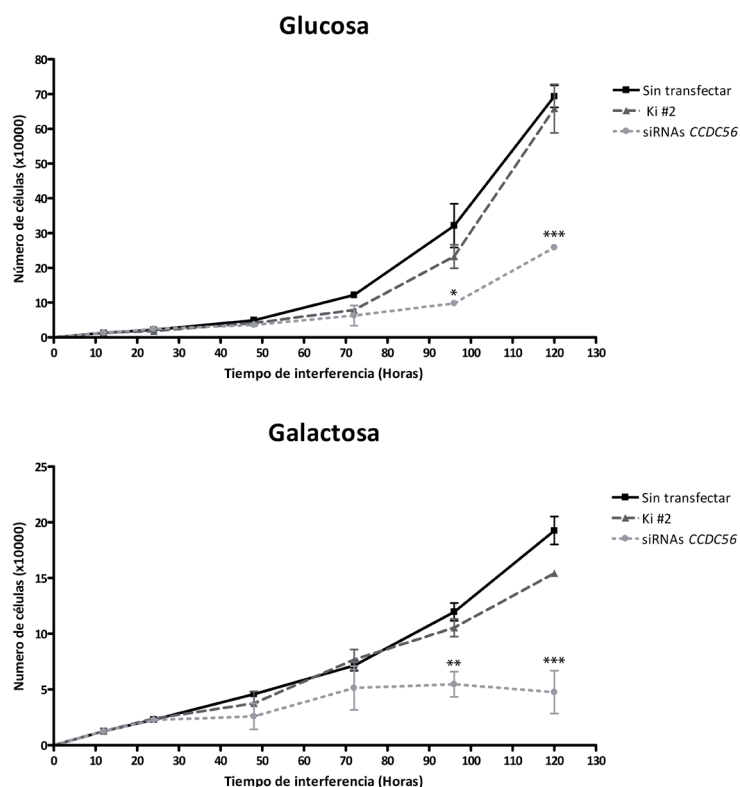


Figura 20. Curvas de crecimiento en glucosa y galactosa de las células con la deficiencia de CCDC56. Las células control o con la interferencia de *CCDC56* fueron cultivadas en medio suplementado con 4.5 g/l de glucosa (panel de arriba) o 0.9 g/l de galactosa (panel de abajo). El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

Medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria

Para confirmar que la deficiencia de CCDC56 estaba produciendo un defecto de la cadena de transporte electrónico, medimos la actividad de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria y del enzima citrato sintasa, utilizado frecuentemente como marcador de la cantidad de masa mitocondrial. Estas medidas se realizaron a las 96 horas de interferencia, ya que hasta este momento el ARNm de *CCDC56* permanece aún en niveles bajos y es un tiempo suficiente para que se pueda manifestar algún fenotipo en las células interferidas.

Como se muestra en la figura 21, no se observan diferencias significativas en la actividad de los complejos I, II y III ni en la actividad citrato sintasa en ninguna de las líneas estudiadas. Sin embargo, en las células con la interferencia de *CCDC56* la actividad del complejo IV se encuentra muy disminuida, hasta aproximadamente el 40% de la actividad de los controles. Así pues, la interferencia de *CCDC56* en células HeLa reproduce los resultados de las líneas “*knock-out*” de *Drosophila melanogaster*, reforzando a CCDC56 como responsable del fenotipo de las larvas KO e indicando que esta proteína es esencial para la correcta actividad de COX en células humanas.

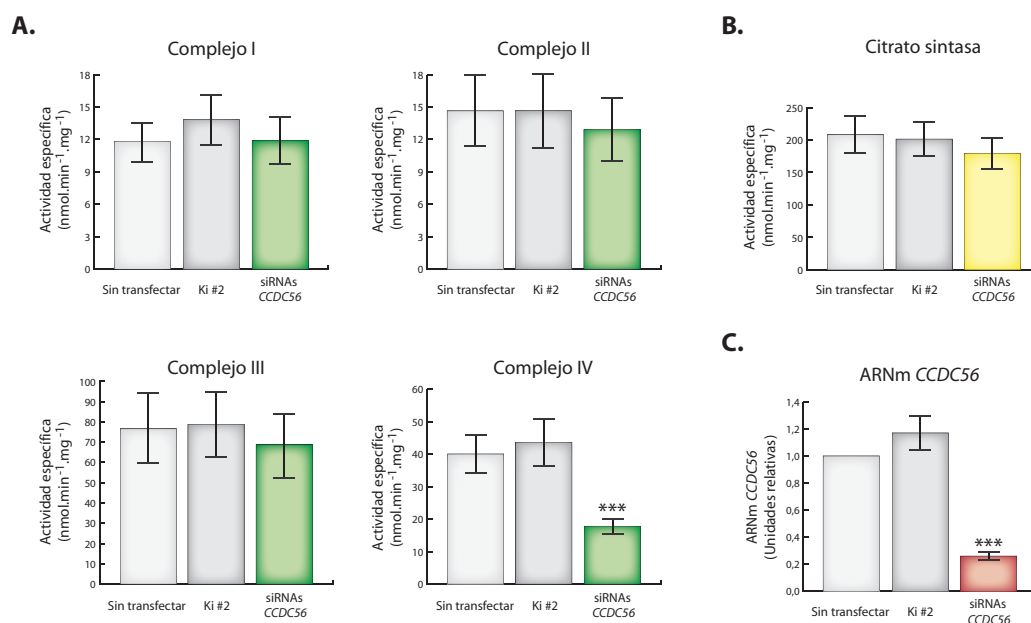


Figura 21. Medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y del enzima citrato sintasa a las 96 horas de interferencia de CCDC56. **A)** Actividades específicas de los complejos I, II, III y IV de las distintas líneas celulares, expresadas en nmol.min⁻¹.mg⁻¹. **B)** Actividad específica de la actividad del enzima citrato sintasa en las distintas líneas celulares, expresada en nmol.min⁻¹.mg⁻¹. **C)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de CCDC56 utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** p<0.001.

Evaluación de los niveles de los complejos de la cadena respiratoria totalmente ensamblados

El defecto del complejo IV que presentan las células con la deficiencia de CCDC56 puede estar causado bien porque se haya producido una disminución en los niveles del mismo, o bien porque, a pesar de tener complejo totalmente ensamblado, éste no sea funcional.

Con el fin de analizar los niveles de complejo IV totalmente ensamblado en las células interferidas, preparamos extractos mitocondriales a las 96 horas de la transfección y separamos los complejos de la cadena respiratoria mediante electroforesis en condiciones nativas (*“Blue Native”* PAGE). Los resultados obtenidos muestran una clara disminución de la cantidad de complejo IV totalmente ensamblado y del supercomplejo III+IV en las líneas interferidas, mientras que, en línea con los resultados de actividad, no hay diferencias en la cantidad de los complejos I, II, III o V (Figura 22A). Del mismo modo, esta disminución en los niveles de COX correlaciona con los ensayos de actividad en gel (*“In Gel Activity assays”*, IGA), en los cuales los geles de BN-PAGE se incuban con los sustratos para cada complejo y un aceptor final de los electrones que al reducirse produce un precipitado coloreado (Figura 22A).

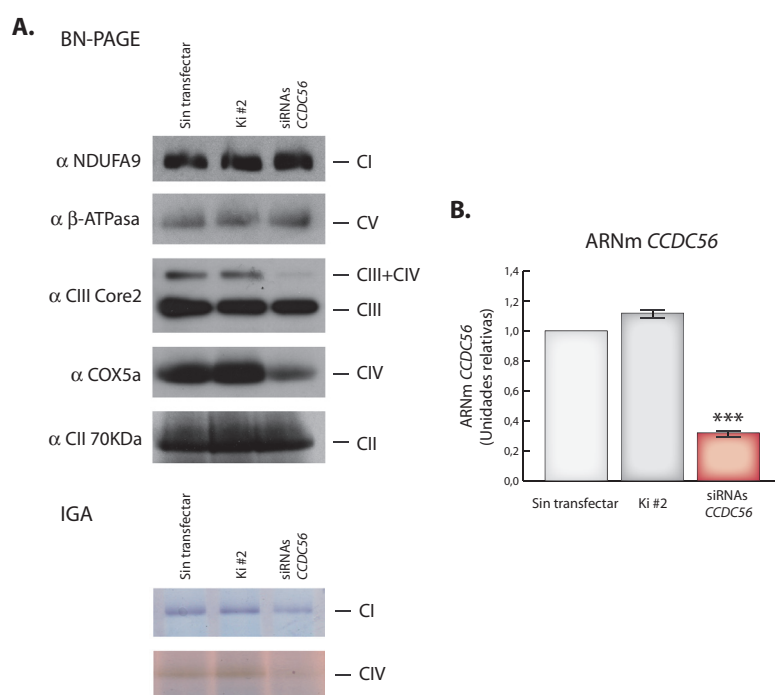


Figura 22. Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) de los complejos de la cadena respiratoria en células con la interferencia de CCDC56. A) Panel superior: BN-PAGE de las líneas control y con la deficiencia de CCDC56. Los complejos del sistema de fosforilación oxidativa se separaron en geles del 4% al 15% y se analizaron sus niveles utilizando los anticuerpos anti-NDUFA9 para el complejo I, anti- β ATPasa para el complejo V, anti-CIII Core2 para el complejo III, anti-COX5a para el complejo IV y anti-CII 70KDa para el complejo II. Panel inferior: ensayo de actividad en gel de los complejos I y IV en las líneas control y con la deficiencia de CCDC56. B) RT-PCR cuantitativa del mensajero de CCDC56 utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$.

Además, en los distintos experimentos de “Blue Native” y sus correspondientes medidas de actividad de la cadena respiratoria hemos observado que existe una clara correlación entre la actividad de COX de las células, su cantidad de complejo totalmente ensamblado y el grado de interferencia obtenido. Estos datos apoyan el hecho de que es la disminución en la cantidad del enzima la responsable de la bajada de actividad y que, por lo tanto, el complejo IV residual que presentan las células interferidas es totalmente activo.

Cuantificación de las proteínas de los complejos de la cadena respiratoria

Dado el bajo nivel de complejo IV ensamblado que presentan las células con CCDC56 interferido, a continuación nos planteamos estudiar cómo se encuentran los niveles de las proteínas que lo componen. Para ello, a las 96 horas de interferencia analizamos mediante Western Blot los niveles de COX1, COX2, COX3, COX4 y COX5a, únicas subunidades del enzima para las que disponemos anticuerpos. Como control adicional del experimento analizamos los niveles de una subunidad de cada uno del resto de complejos.

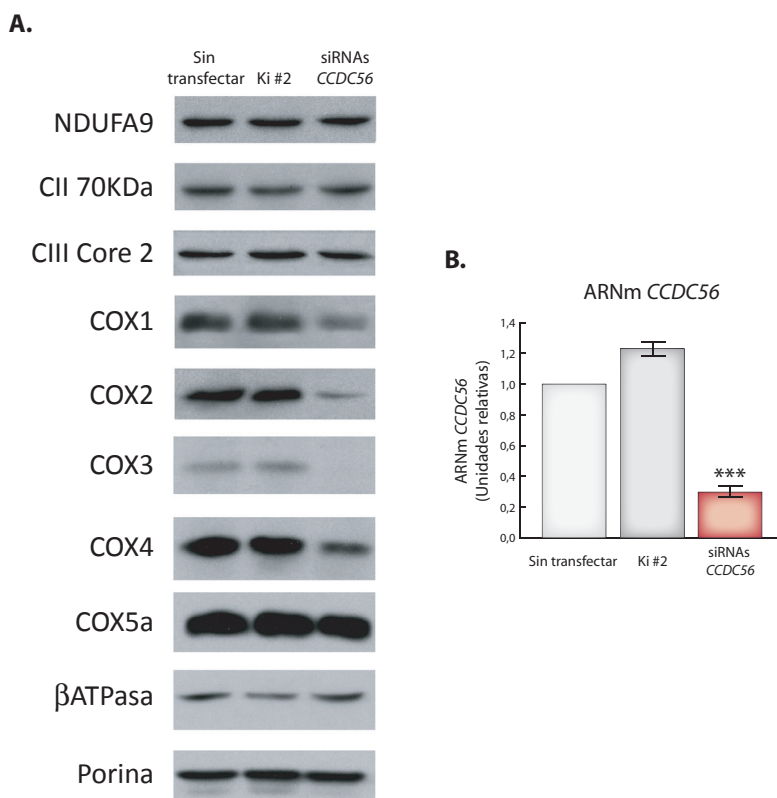


Figura 23. Cuantificación mediante Western Blot de los niveles de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria en las líneas con la interferencia de *CCDC56*. **A)** Western Blot de las subunidades NDUFA9 del complejo I, CII 70KDa del complejo II, CIII Core2 del complejo III, COX1, COX2, COX3, COX4 y COX5a del complejo IV y β ATPasa del complejo V en extractos mitocondriales de las líneas control y con la interferencia de *CCDC56*. La porina se utilizó como control de carga del experimento. **B)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$.

Como se muestra en la figura 23, la disminución de los niveles de *CCDC56* provoca una caída tanto de las subunidades codificadas en el ADNmt COX1, COX2 y COX3 como de la subunidad codificada en el núcleo COX4, mientras que los niveles de COX5a apenas se encuentran afectados. Por otro lado, y en concordancia con los datos obtenidos anteriormente, no observamos ningún cambio en los niveles de las proteínas del resto de complejos (NDUFA9 del complejo I, CII 70KDa del complejo II, CIII Core2 del complejo III y β ATPasa del complejo V).

Cuantificación de los mensajeros mitocondriales

La disminución de los niveles de las subunidades del complejo IV codificadas en el ADNmt causada por el “*knock-down*” de *CCDC56*, podría deberse a que esta proteína esté participando en la transcripción, procesamiento o estabilidad de sus mensajeros. Para valorar si los bajos niveles de COX1, COX2 o COX3 estaban causados por un defecto en la expresión de alguno de sus transcritos, cuantificamos mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de los mensajeros de las tres

subunidades de COX. Como control cuantificamos algunos de los ARNm mitocondriales que codifican subunidades del resto de complejos de la cadena respiratoria.

Los resultados mostraron que las células interferidas presentan niveles similares a los controles de todos los mensajeros analizados y que, por lo tanto, los bajos niveles de las proteínas COX1, COX2 y COX3 no se deben a un problema en la transcripción o la estabilidad de sus mensajeros (Figura 24).

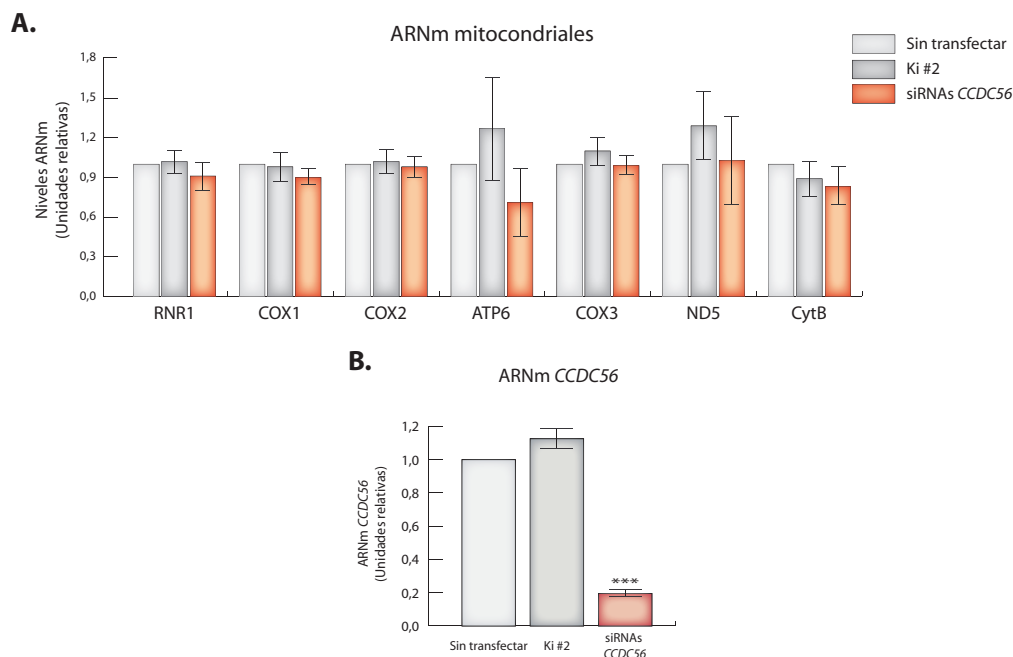


Figura 24. Cuantificación mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de los ARNm mitocondriales en las líneas con *CCDC56* interferido. A) RT-PCR cuantitativa utilizando SYBR Green (Applied Biosystems) y oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes analizados. Se analizaron los niveles de los ARNm de COX1, COX2 y COX3 del complejo IV, ND5 del complejo I, CytB del complejo III, ATP6 del complejo V y RNR1 (ARNr 12S) en las células control y con la interferencia de *CCDC56*. Los niveles de ARNm se expresan en unidades relativas con respecto a las células HeLa. **B)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$.

Análisis in vivo de la síntesis de proteínas mitocondriales

Puesto que los niveles de los mensajeros mitocondriales no se encontraban afectados en las células interferidas para *CCDC56*, nos planteamos si los bajos niveles de las subunidades de COX se debían a una traducción menos eficiente de sus transcritos.

Para determinar si *CCDC56* está implicado en la traducción de las subunidades del complejo IV codificadas en el ADNmt, se llevó a cabo el marcaje *in vivo* de los productos de la traducción mitocondrial en células interferidas durante 72 horas. Para ello, como se detalla en materiales y métodos, las células control e interferidas se incubaron con metionina marcada con el

radioisótopo S^{35} durante 30, 60 o 90 minutos, en presencia de un agente bloqueante de la traducción citoplasmática. Los productos de la traducción mitocondrial se separaron mediante electroforesis en gradiente en condiciones desnaturalizantes, los geles fueron autorradiografiados y se cuantificó la señal de cada una de las proteínas. Los resultados sugerían que las células interferidas presentan una tasa de síntesis de COX1 ligeramente inferior a los controles, mientras que la traducción de COX2 y COX3, así como la del resto de proteínas codificadas en el ADNmt no se encuentra afectada en la deficiencia de CCDC56 (Figuras 25 y 26).

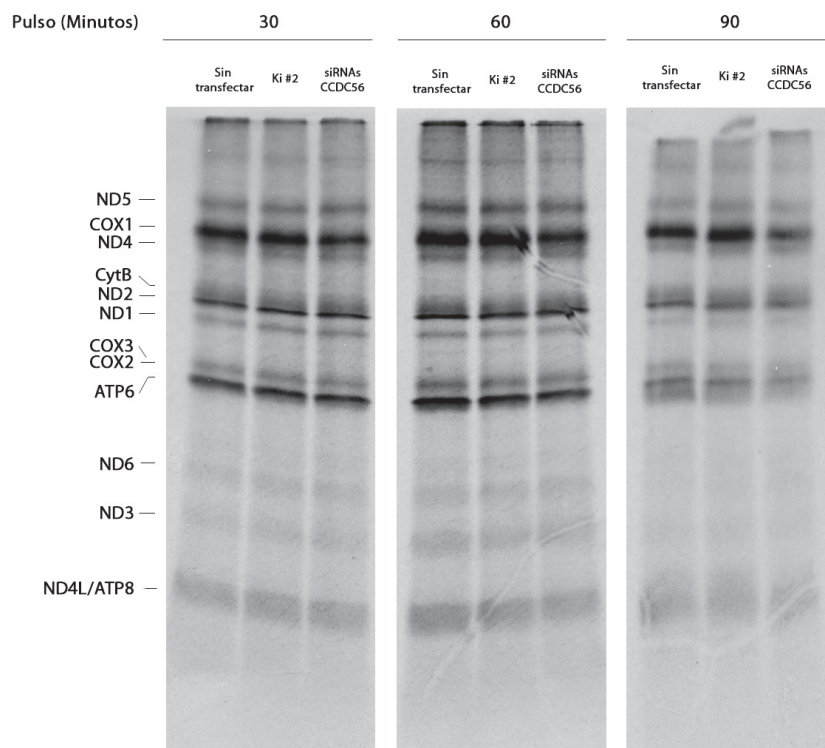


Figura 25. Biosíntesis de proteínas mitocondriales en células control y con *CCDC56* interferido. La síntesis de proteínas citosólicas se inhibió con 100 μ g/ml de emetina. Las proteínas mitocondriales se marcaron con S^{35} -Met en tres pulsos de 30, 60 y 90 minutos según se describe en materiales y métodos. Las proteínas marcadas se separaron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE en gradiente del 15 al 20% y fueron analizados posteriormente por autorradiografía directa de los geles.

Como se puede observar en la autorradiografía (Figura 25) y en la posterior cuantificación de la señal de las distintas proteínas (Figura 26), a los 30 minutos de pulso la intensidad relativa de la banda de COX1 es menor que en los controles y, además, disminuye a medida que aumenta el tiempo de marcaje. Esta diferencia creciente en la incorporación de S^{35} -metionina puede ser debida a que la deficiencia de CCDC56 esté produciendo un defecto combinado de la traducción de COX1 junto con un defecto en la estabilidad de la proteína recién sintetizada. Si las células interferidas están sintetizando una menor cantidad de COX1 y, a su vez, esta proteína tiene una menor estabilidad, la diferencia en la cantidad de proteína marcada entre los controles y las células

interferidas se irá haciendo mayor a medida que vamos aumentando el tiempo de pulso.

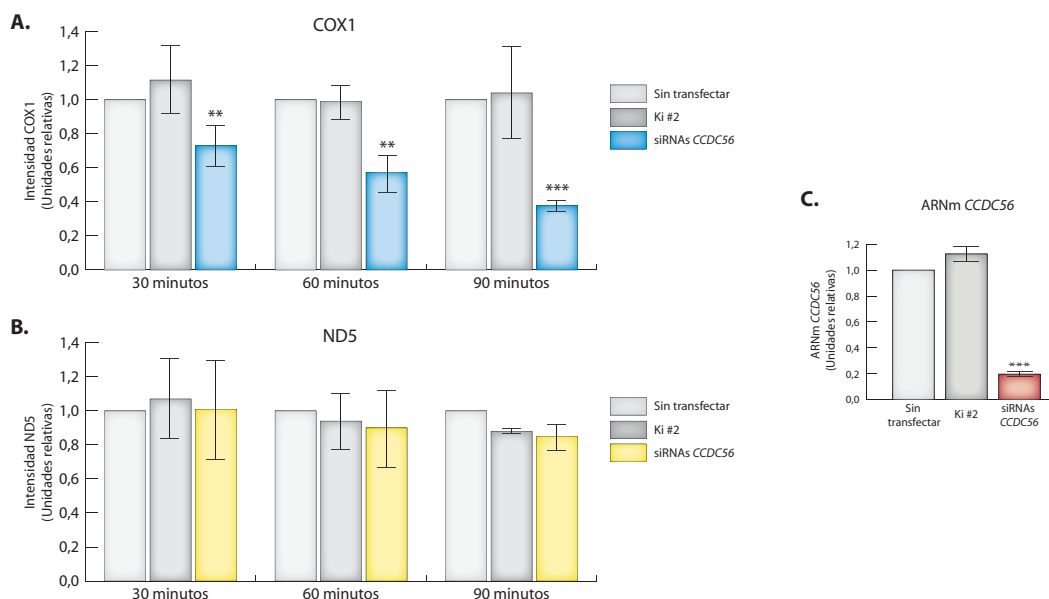


Figura 26. Cuantificación de la señal correspondiente a COX1 y ND5 en los experimentos de pulso en células control y con *CCDC56* interferido. A y B) Cuantificación de la señal de las proteínas COX1 (A) y ND5 (B) en los tres tiempos de pulso en células control e interferidas. La señal correspondiente a cada banda se cuantificó utilizando el Typhoon Trio phosphorimager system (GE Healthcare). **C)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$.

Análisis in vivo de la estabilidad de las proteínas mitocondriales

Para confirmar nuestra hipótesis de que en ausencia de *CCDC56* la proteína COX1 tiene una menor estabilidad, llevamos a cabo experimentos de pulso y caza a las 72 horas de la transfección de los siRNAs. Para ello, tras un marcaje de 30 minutos, se dejó a las células control e interferidas seguir creciendo en un medio que no contenía metionina radiactiva durante 0, 2, 4 o 7 horas.

Como muestran los geles y la cuantificación de la señal, en ausencia de *CCDC56* la proteína COX1 recién sintetizada se degrada más rápidamente que en las células control, desapareciendo prácticamente a las siete horas de su síntesis. Esta degradación más rápida no se observa en COX2, COX3, ni en el resto de proteínas codificadas en el ADNmt (Figuras 27 y 28).

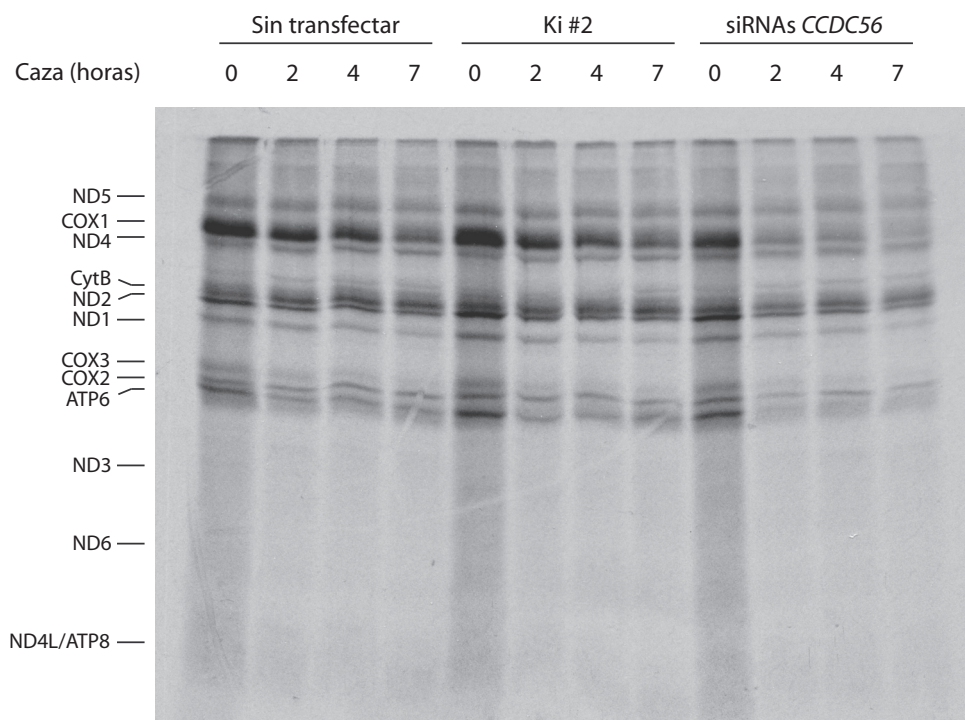


Figura 27. Análisis de la estabilidad de las proteínas mitocondriales sintetizadas de novo en células control y con *CCDC56* interferido. La síntesis de proteínas citosólicas se inhibió con 100 µg/ml de anisomicina y las proteínas se marcaron con un pulso de 30 minutos de S^{35} -Met (0h). Una vez retirados el antibiótico anisomicina y la S^{35} -Met del medio, las células fueron incubadas durante 2h, 4h y 7h en medio completo (cazas). Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE en gradiente del 15-20% y los geles se autorradiografiaron.

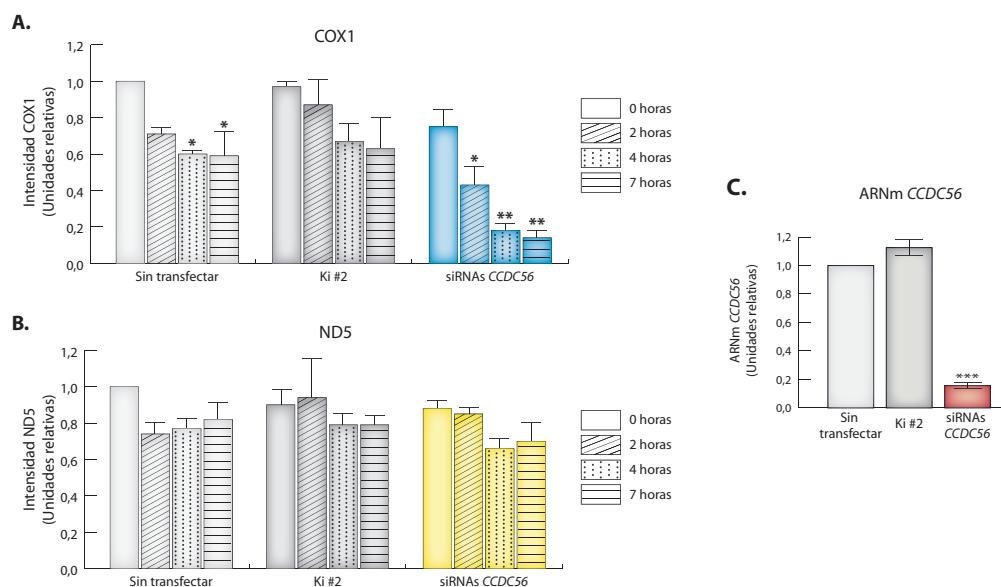


Figura 28. Cuantificación de la señal correspondiente a COX1 y ND5 en los experimentos de pulso y caza en células control y con *CCDC56* interferido. A y B) Cuantificación de la señal de las proteínas COX1 (A) y ND5 (B) en cada tiempo de caza en células control e interferidas. La señal correspondiente a cada banda se cuantificó utilizando el Typhoon Trio phosphorimager system (GE Healthcare). C) RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

Como se ha mostrado en los Western Blot (Figura 23), a las 96 horas de interferencia de *CCDC56* las células presentan niveles bajos de COX2 y COX3 y sin embargo, no hemos observado ningún defecto en su síntesis ni, aparentemente, en su degradación. Los bajos niveles de estas dos proteínas pueden explicarse si en las células interferidas se está produciendo una degradación de ambas más rápida que en los controles pero en una ventana de tiempo más larga que las 7 horas analizadas en nuestros ensayos de pulso y caza.

Análisis del ensamblaje del complejo IV mediante BN-PAGE y 2D BN/SDS-PAGE

Como hemos visto, la falta de *CCDC56* provoca un leve defecto en la síntesis de COX1 que va acompañado de una degradación rápida de la proteína recién sintetizada. Esto unido al hecho de que COX2, COX3 y la subunidad codificada en el núcleo COX4 se encuentran disminuidas en células con la interferencia de *CCDC56* parece sugerir la existencia de un defecto en el ensamblaje del complejo IV. Este fenómeno ya se ha observado en levaduras y en algunos pacientes con defectos de ensamblaje del mismo, en los cuales el bloqueo en la formación de COX provoca la degradación de los intermediarios de ensamblaje y la disminución, por tanto, de las proteínas que los forman (Nijtmans et al., 2001, Antonicka et al., 2003a).

Por esta razón nos planteamos estudiar si el proceso de ensamblaje del complejo IV se estaba produciendo de forma correcta. En primer lugar analizamos la dinámica de ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria. Para ello se trataron las células con el antibiótico cloranfenicol, inhibidor de la traducción mitocondrial, durante dos días. En estas condiciones de ausencia de síntesis, los complejos de la cadena respiratoria se degradan hasta casi su desaparición. Posteriormente, se retiró el cloranfenicol del medio y se recogieron muestras seriadas con el fin de estudiar mediante BN-PAGE la cinética de formación de los complejos de la cadena respiratoria tanto en células control como en células con bajos niveles de *CCDC56*.

Los resultados se muestran en la figura 29, donde se observa que las células control van recuperando los niveles de complejo IV hasta alcanzar a las 72 horas de la retirada del cloranfenicol el nivel de las células que no han sido tratadas con el antibiótico. Sin embargo, en las células interferidas apenas hay aparición del complejo IV totalmente ensamblado hasta las 72 horas de retirada del cloranfenicol, indicando que *CCDC56* es esencial para su formación. La formación del resto de complejos de la cadena respiratoria no se encuentra afectada en las células deficientes para *CCDC56*, indicando que esta proteína interviene específicamente en la biogénesis de COX.

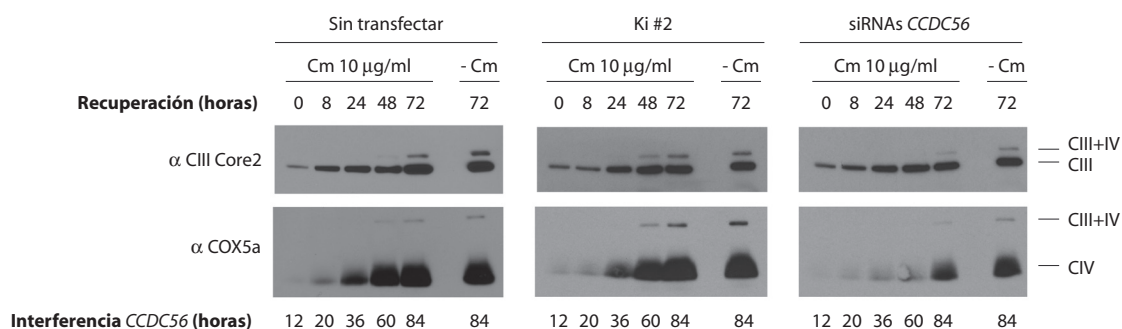


Figura 29. Cinética de formación de los complejos III y IV de la cadena respiratoria en células control y con *CCDC56* interferido mediante BN-PAGE. Se trataron las células control e interferidas con 5 μ g/ml de cloranfenicol (Cm) durante 2 días y tras la retirada del antibiótico se dejaron recuperar los niveles de complejo totalmente ensamblado durante 8h, 24h, 48h y 72h. El complejo III se detectó con anticuerpos contra la subunidad CIII Core2. El complejo IV se detectó con anticuerpos contra la subunidad COX5a.

Con objeto de analizar si este defecto en la formación del complejo IV se debe a que *CCDC56* está participando en su ensamblaje, a las 96 horas de interferencia y tras la separación de los complejos de la cadena respiratoria en geles de BN-PAGE se llevó a cabo una segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes. Estos geles 2D BN/SDS-PAGE permiten la separación de las proteínas que componen cada uno de los complejos y sus respectivos subcomplejos.

En primer lugar, confirmando los resultados observados tanto BN-PAGE como en Western Blot, en ausencia de *CCDC56* observamos una menor cantidad de complejo IV totalmente ensamblado (S4) y una menor cantidad de las proteínas que lo componen en comparación con los controles (Figura 30 A y C). Por otro lado, el análisis de estos geles 2D BN/SDS-PAGE reveló que en las células sin transfectar y las células transfectadas con el Ki #2 el ensamblaje del complejo IV procede de forma normal, mientras que en las células interferidas se observa la acumulación de un subcomplejo que contiene al menos COX4. Se trata muy probablemente de una acumulación del subcomplejo S2, ya que su peso molecular es similar al descrito para este subcomplejo (Nijtmans et al., 1998) y aunque no se observa de forma tan evidente, COX1 y COX5a también parecen formar parte del mismo. Esta acumulación de subcomplejos en las células interferidas nos muestra que *CCDC56* juega un papel fundamental para el ensamblaje de complejo IV y que se trata por lo tanto de una nueva proteína que interviene en los pasos iniciales de la formación de la citocromo *c* oxidasa en células humanas.

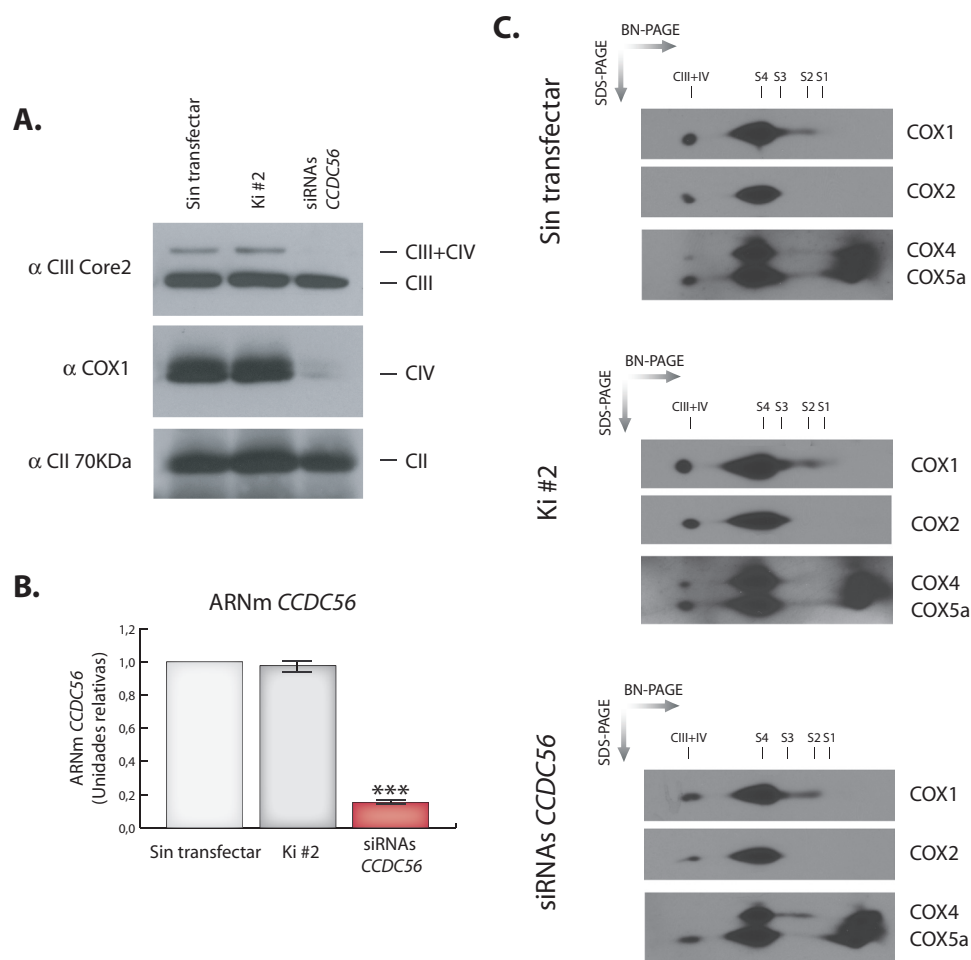


Figura 30. Análisis de los intermediarios de ensamblaje del complejo IV mediante 2D BN/SDS-PAGE en células control y con *CCDC56* interferido. A) BN-PAGE de las líneas control y con la deficiencia de *CCDC56* a las 96 horas de interferencia. Para los experimentos de 2D BN/SDS-PAGE las células fueron retransfectadas con los siRNAs a las 48 horas de la primera transfección. Los complejos de la cadena respiratoria se separaron en geles del 4% al 18% y se analizaron sus niveles utilizando los anticuerpos anti-CIII Core2 para el complejo III, anti-COX1 para el complejo IV y anti-CII 70KDa para el complejo II. **B)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** p<0.001. **C)** 2D BN/SDS-PAGE. Tras la separación en geles de “Blue Native” las muestras se separaron en geles desnaturalizantes al 12% de acrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Se analizaron las subunidades COX1, COX2, COX4 y COX5a con anticuerpos específicos en células sin transfectar (panel superior), transfectadas con el control Ki #2 (panel central) y transfectadas con los siRNAs inductores de la interferencia de *CCDC56* (panel inferior).

3.4. Rescate del fenotipo mediante la sobreexpresión de *CCDC56*

Con objeto de confirmar que los fenotipos observados se deben exclusivamente al efecto de la interferencia de *CCDC56*, se diseñó un experimento de rescate para revertir el defecto de COX que presentan las células interferidas.

Para ello se utilizó la línea celular, previamente generada, que sobreexpresa de manera estable la proteína *CCDC56*-Flag. La transfección de los siRNAs en esta línea interferirá únicamente el

gen endógeno y no la versión sobreexpresada, ya que esta línea expresa una construcción que comprende exclusivamente la región codificante de *CCDC56* y no la región 3' UTR contra la que van dirigidos los tres siRNAs (Figura 31). De esta forma conseguiremos expresar la proteína CCDC56-Flag en células en las que el gen *CCDC56* endógeno está interferido para así analizar si rescata su fenotipo.

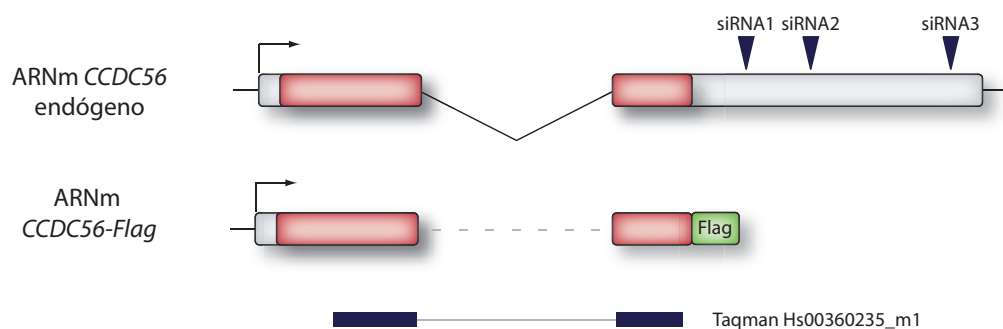


Figura 31. Representación esquemática de las construcciones utilizadas en los experimentos de rescate. Para los experimentos de complementación se utilizó una construcción *CCDC56-Flag* que no contenía la región 3'UTR del mensajero endógeno por lo que no estaba sujeta a la interferencia inducida por los siRNAs utilizados. La sonda Taqman utilizada para la cuantificación del ARNm de *CCDC56* no discrimina entre el mensajero endógeno y el mensajero que expresa la proteína *CCDC56-Flag*.

La medida de la actividad del complejo IV a las 96 horas de interferencia mostró que, tanto en células HeLa como en aquellas que contienen el vector pIRESpuro2, la transfección de los siRNAs contra *CCDC56* provocaba una caída en la actividad de COX. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales las células que sobreexpresan *CCDC56-Flag* presentan una actividad del complejo IV similar a los controles, rescatándose completamente el fenotipo de la interferencia (Figura 32A). La actividad del resto de los complejos de la cadena respiratoria, así como la actividad citrato sintasa (Figura 32B) no presentan ninguna variación en las células interferidas. La cuantificación del ARNm de *CCDC56*, utilizando una sonda Taqman que no discrimina entre la forma endógena del gen y la sobreexpresada, mostró que en estas células los niveles de expresión del ARNm *CCDC56-Flag* son unas 30 veces superiores a los niveles del gen endógeno (Figura 32C). Estos resultados nos permiten concluir que es la ausencia de *CCDC56* la responsable de los fenotipos que hemos observado en las células interferidas.

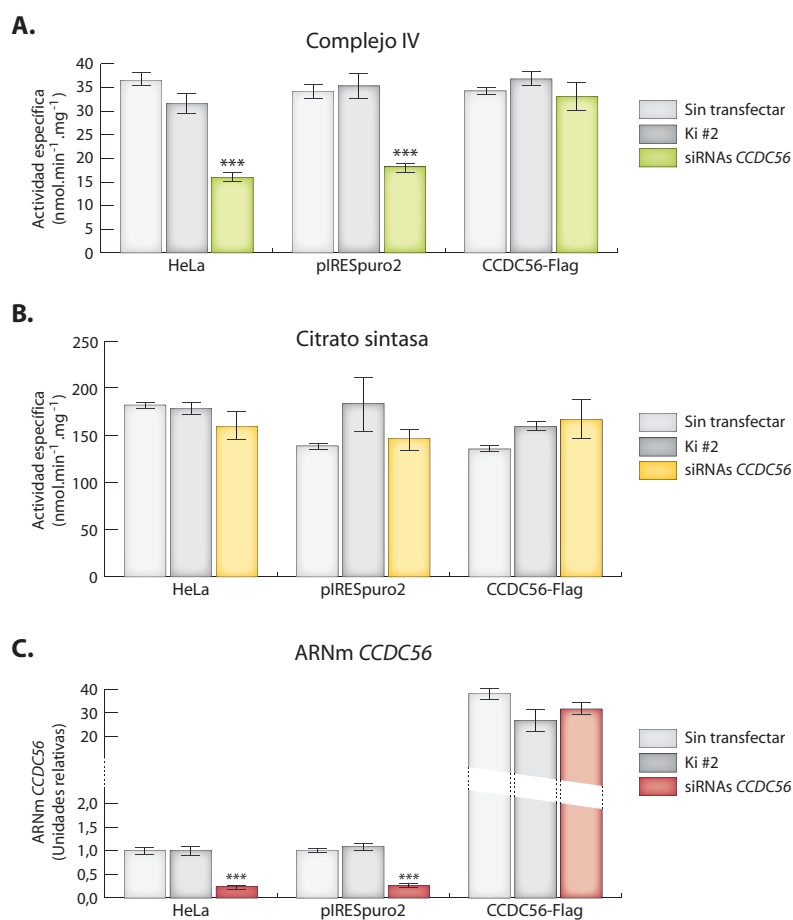


Figura 32. Rescate de la actividad del complejo IV mediante la sobreexpresión de CCDC56-Flag. A) Actividad específica del complejo IV en células HeLa, en células HeLa transfectadas con el vector pIRESpuro2 y en células que sobreexpresan CCDC56-Flag. Cada una de estas líneas fue a su vez transfectada con el siRNA control Ki #2 y los siRNAs contra *CCDC56*. La actividad específica está expresada en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. **B)** Actividad específica del enzima citrato sintasa en éstas líneas expresada en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. **C)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$.

3.5. Sobreexpresión de CCDC56 en células HeLa

El siguiente paso en la caracterización funcional de CCDC56 consistió en analizar el efecto que producía la sobreexpresión de esta proteína en células HeLa. Todos estos experimentos se han llevado a cabo en la línea celular que sobreexpresa CCDC56-Flag.

Medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria

Puesto que la interferencia de CCDC56 provocaba una caída en la actividad del complejo

IV, analizamos el efecto de su sobreexpresión sobre la actividad de los complejos de la cadena respiratoria. Como podemos observar en la figura 33, la sobreexpresión de CCDC56 no tiene ningún efecto significativo sobre la actividad de los complejos I, II y IV. Tampoco se observa ningún cambio en la actividad citrato sintasa, marcador de la cantidad de mitocondrias. Curiosamente, sin embargo, el aumento de CCDC56 está provocando un incremento en la actividad del complejo III pese a que la interferencia de esta proteína no afecta a la actividad del mismo.

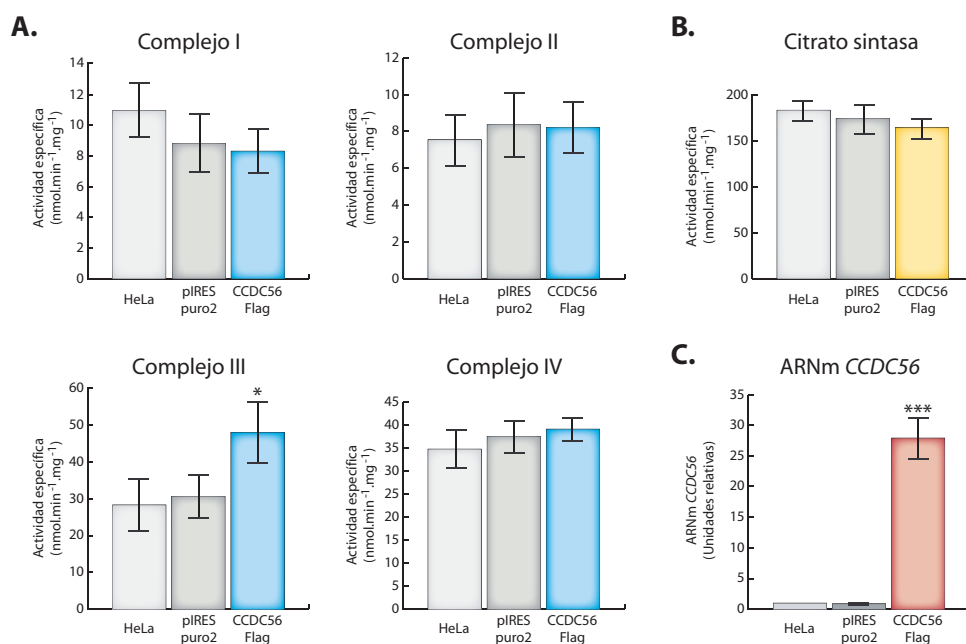


Figura 33. Medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y del enzima citrato sintasa en células que sobreexpresan CCDC56-Flag. **A)** Las gráficas representan las actividades específicas de los complejos I, II, III y IV de células HeLa, células transfectadas con el vector pIRES puro2 y células que sobreexpresan CCDC56-Flag desde el mismo vector. Las actividades específicas están expresadas en nmol.min⁻¹.mg⁻¹. **B)** Actividad específica de la actividad del enzima citrato sintasa en las distintas líneas celulares, expresada en nmol.min⁻¹.mg⁻¹. **C)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** p<0.001.

Evaluación de los niveles de los complejos de la cadena respiratoria totalmente ensamblados

Para confirmar los resultados obtenidos con la medida de actividad de los complejos, se llevaron a cabo experimentos de “Blue Native” para analizar los niveles de todos los complejos de la cadena respiratoria. Como muestran los resultados del BN-PAGE, la sobreexpresión de CCDC56-Flag no afecta a la cantidad de complejo I, II, IV o V totalmente ensamblados, corroborando las medidas de actividad llevadas a cabo anteriormente (Figura 34). Sin embargo, no se observa un aumento en la cantidad de complejo III totalmente ensamblado, contrariamente a lo que podrían sugerir las medidas espectrofotométricas de la actividad del mismo.

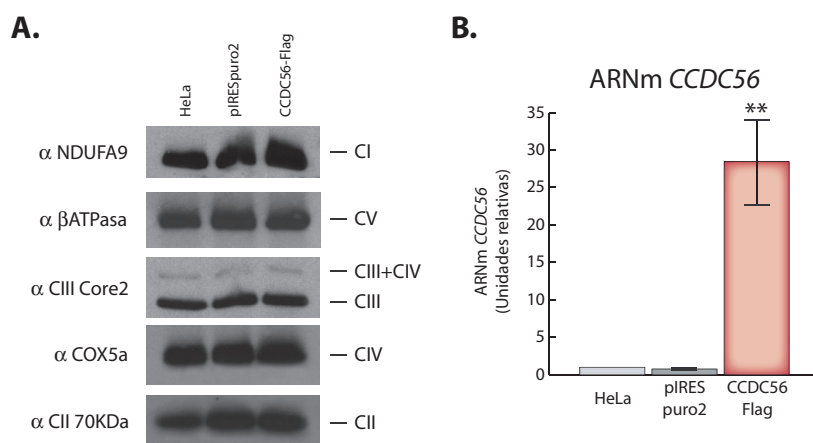


Figura 34. Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) de los complejos de la cadena respiratoria en células sobreexpresando CCDC56-Flag. A) BN-PAGE de las líneas control y sobreexpresando CCDC56-Flag. Los complejos del sistema de fosforilación oxidativa se separaron en los geles nativos con un gradiente del 4 al 15% de acrilamida y se analizaron sus niveles utilizando los anticuerpos anti-NDUFA9 para el complejo I, anti- β ATPase para el complejo V, anti-CIII Core2 para el complejo III, anti-COX5a para el complejo IV y anti-CII 70KDa para el complejo II. **B)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como ** $p < 0.01$.

Cuantificación de las proteínas de los complejos de la cadena respiratoria

A continuación y puesto que en las células interferidas los niveles de las subunidades de COX se encontraban muy disminuidos, nos planteamos analizar mediante Western Blot el efecto de la sobreexpresión de CCDC56 sobre los niveles de las subunidades del complejo IV, así como de una subunidad de cada uno del resto de complejos.

Como se observa en la figura 35, no se aprecian cambios significativos en el nivel de ninguna de las subunidades que forman parte del complejo IV ni en aquellas subunidades pertenecientes al resto de complejos de la cadena de transporte electrónico que se han analizado en este experimento.

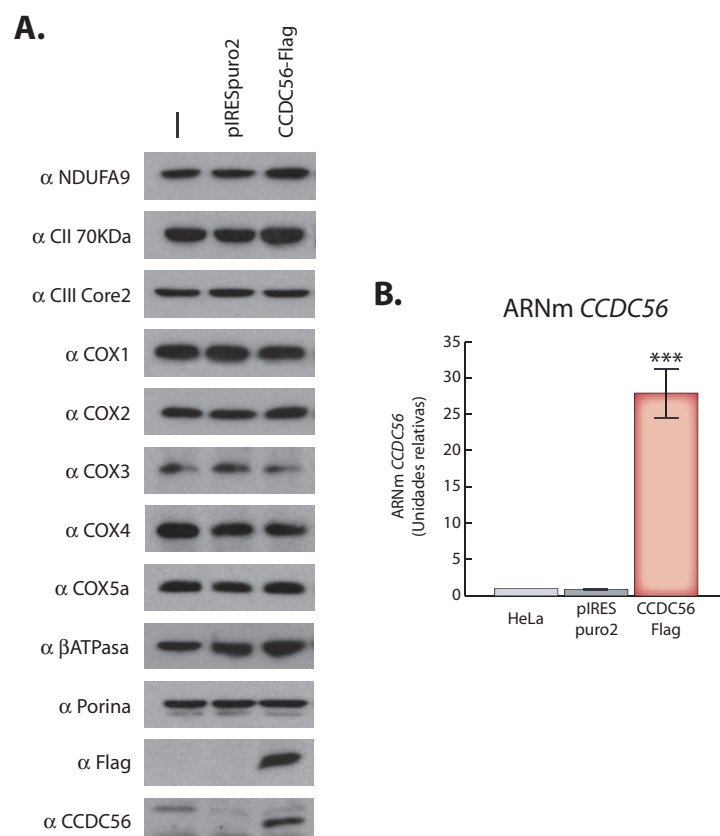


Figura 35. Cuantificación mediante Western Blot de los niveles de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS en las líneas que sobreexpresan CCDC56-Flag. A) Western Blot de las subunidades NDUFA9 del complejo I, CII 70KDa del complejo II, CIII Core2 del complejo III, COX1, COX2, COX3, COX4 y COX5a del complejo IV y β-ATPasa del complejo V en extractos mitocondriales de las líneas control y con la sobreexpresión de CCDC56-Flag. La sobreexpresión de CCDC56-Flag se confirmó con anticuerpos anti-Flag y anti-CCDC56. La porina se utilizó como control de carga del experimento. **B)** RT-PCR cuantitativa del mensajero de *CCDC56* utilizando sondas Taqman específicas. Los niveles de ARNm se estandarizaron frente a los niveles del ARNr 18S. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$.

3.6. Búsqueda de proteínas que interaccionen con CCDC56

Con objeto de profundizar en el estudio de la función de CCDC56, a continuación nos planteamos la búsqueda de posibles interactores de esta proteína utilizando para ello la línea de células HeLa que sobreexpresa CCDC56-Flag.

En primer lugar, para analizar qué peso molecular presenta CCDC56 en condiciones nativas llevamos a cabo experimentos de BN-PAGE que nos permitirían estudiar cuál es el peso molecular de CCDC56 en condiciones nativas y por lo tanto indicarían si se encuentra unido a otras proteínas. Sin embargo, no obtuvimos ninguna señal tras la incubación de estas membranas con anticuerpos anti-Flag en las condiciones utilizadas.

Puesto que en los geles de BN-PAGE no se obtuvo ninguna señal de CCDC56-Flag, llevamos a cabo geles 2D BN/SDS-PAGE que facilitan la detección de las proteínas debido a que se utilizan condiciones desnaturalizantes. Como se muestra en la figura 36, utilizando anticuerpos anti-Flag se puede observar que CCDC56 se encuentra formando varios complejos discretos que varían en tamaño desde los aproximadamente 12 KDa de CCDC56-Flag monomérica hasta algo más de 880 KDa. Este resultado nos indica que CCDC56 en condiciones nativas se encuentra interactuando con otras proteínas, que probablemente están participando junto con CCDC56 en el ensamblaje del complejo IV. No podemos descartar que en estos complejos CCDC56-Flag esté interactuando con alguno de los intermediarios de ensamblaje del complejo IV.

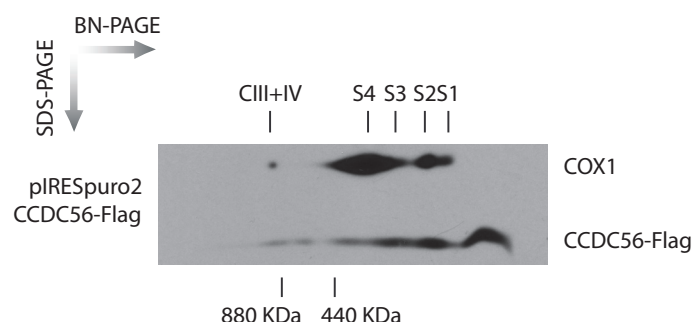


Figura 36. Análisis del peso molecular de CCDC56-Flag en condiciones nativas mediante 2D BN/SDS-PAGE. Tras la separación de los extractos mitocondriales de células que sobreexpresan CCDC56-Flag en geles de “Blue Native”, éstos se separaron en geles desnaturalizantes al 12% de acrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Se indican los tres intermediarios de ensamblaje del complejo IV (S1, S2 y S3) y el complejo totalmente ensamblado (S4) detectados con anti-COX1. CCDC56-Flag se detectó con anticuerpos anti-Flag.

Con el fin de identificar las proteínas con las que interacciona CCDC56, a continuación nos planteamos llevar a cabo una inmunoprecipitación de la proteína CCDC56-Flag. Para ello, las mitocondrias de las líneas CCDC56-Flag y pIRESpuro2, como control negativo, se trataron con 0.5% de laurilmaltósido que permite extraer CCDC56-Flag de la membrana mitocondrial y se llevó a cabo la inmunoprecipitación de esta proteína con anticuerpos anti-Flag. Tras comprobar mediante Western Blot que CCDC56-Flag se había eluído correctamente, analizamos que proteínas se encontraban presentes en este eluído mediante espectrometría de masas en el servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

El análisis mediante espectrometría de masas no ha permitido hasta la fecha identificar ninguna proteína presente en este eluído debido a que se encontraban en muy baja proporción, lo que hace necesario repetir este experimento partiendo de una mayor cantidad de material para así identificar a las proteínas candidatas a interaccionar con CCDC56 y obtener nuevos datos sobre su función.

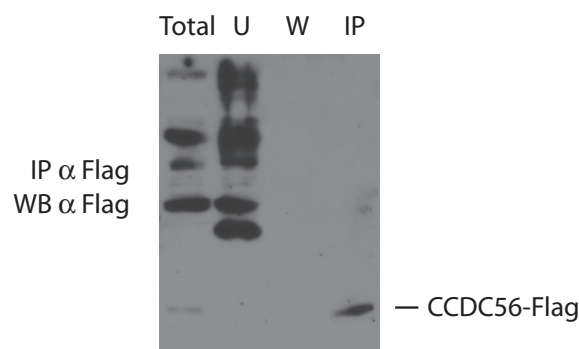


Figura 36. Inmunoprecipitación de CCDC56-Flag. Utilizando anticuerpos anti-Flag unidos covalentemente a agarosa se inmunoprecipitó la proteína CCDC56-Flag a partir de extractos mitocondriales de la línea que la sobreexpresa (Total). U indica las proteínas no unidas al anticuerpo, W muestra las proteínas liberadas tras el lavado de la resina e IP representa el inmunoprecipitado. La presencia de CCDC56-Flag se analizó mediante Western Blot con anticuerpos anti-Flag.

4. Búsqueda de mutaciones en el gen *CCDC56* en pacientes con déficit del complejo IV

Aproximadamente el 80% de las enfermedades mitocondriales están producidas por defectos en el ADN nuclear. Teniendo en cuenta que aproximadamente la mitad de las proteínas que componen el proteoma mitocondrial aún no han sido identificadas, no es de extrañar que en una gran parte de los pacientes diagnosticados de enfermedad mitocondrial se desconozca su causa genética. Puesto que la ausencia de CCDC56 provoca un severo déficit del complejo IV en la línea celular humana HeLa, este gen es un excelente candidato a secuenciar en pacientes aún no diagnosticados que presentan alguna enfermedad mitocondrial causada por un déficit aislado de este complejo.

Se diseñaron oligonucleótidos que cubrían tanto los exones como la región intrónica del gen, que se utilizaron para secuenciar ADN procedente de 23 pacientes del grupo del Dr. Miguel Ángel Martín (Hospital 12 de Octubre, Madrid) y 2 pacientes del grupo del Dr. Francesc Cardellach (Hospital Clínic, Barcelona) que presentaban un déficit aislado del complejo IV. La secuenciación no reveló la presencia de mutaciones patogénicas en ninguno de ellos. Posteriormente el estudio se amplió para incluir a 13 pacientes más que fueron secuenciados por el grupo del Dr. Massimo Zeviani (Istituto Carlo Besta, Milán) y nuevamente no se identificaron mutaciones potencialmente patogénicas en ninguno de ellos que explicaran el origen de su defecto en el complejo IV.

DISCUSIÓN

1. Identificación de CCDC56

La principal función de la mitocondria es la producción de energía química en forma de ATP, ya que éste es necesario para la mayor parte de los procesos fisiológicos de la célula. La mayor parte del ATP celular es sintetizado en la mitocondria a partir de la oxidación de los cofactores reducidos provenientes del catabolismo de los nutrientes, en un proceso llevado a cabo por los cinco complejos enzimáticos de la cadena respiratoria que se conoce como fosforilación oxidativa (Wallace and Fan, 2010). La mayor parte de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria se encuentran codificadas en el núcleo, son traducidas en el citoplasma e importadas a la mitocondria. Únicamente 13 de las subunidades estructurales de los complejos son codificadas por el ADNmt, las cuales al ensamblarse junto con las proteínas codificadas en el ADN nuclear formarán los holoenzimas maduros. Dada la complejidad estructural de estos enzimas y teniendo en cuenta que las subunidades que los componen se encuentran codificadas en dos genomas físicamente separados en la célula, no es de extrañar que el proceso de ensamblaje requiera la participación de un gran número de proteínas accesorias, conocidas como factores de ensamblaje. Los factores de ensamblaje son proteínas esenciales para la formación de los complejos que no forman parte del complejo maduro y aseguran el correcto ensamblaje y funcionamiento de los enzimas.

El ensamblaje de COX, el complejo IV de la cadena respiratoria, es un proceso lineal en el cual las subunidades y cofactores que lo componen se van uniendo de forma secuencial y ordenada (Nijtmans et al., 1998). El estudio mediante geles bidimensionales BN/SDS-PAGE

de los intermediarios de ensamblaje del complejo IV ha permitido conocer el orden en el que se incorporan sus subunidades pero ha proporcionado poca información sobre las proteínas accesorias que intervienen en cada paso.

Una estrategia que ha permitido la identificación de un gran número de los factores que participan en el ensamblaje del complejo IV ha sido el estudio de mutantes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Hasta la fecha se han identificado en este organismo más de 20 proteínas auxiliares que intervienen en la formación de COX, cuyas funciones abarcan todas las etapas de la formación del mismo, desde la transcripción de las subunidades codificadas en el ADNmt o el procesamiento y traducción de sus transcritos, hasta la síntesis de sus cofactores o el ensamblaje y la estabilidad de las subunidades que formarán el complejo maduro (Fontanesi et al., 2006).

Un gran número de los factores de que participan en la formación del complejo IV en levadura se encuentran conservados a lo largo de la escala evolutiva, lo que ha permitido la identificación de sus ortólogos en humanos. No obstante, el número de factores de ensamblaje identificados hasta la fecha en humanos es inferior al número de factores conocidos en *S. cerevisiae*. Puesto que a lo largo de la evolución se han ido incorporando nuevas subunidades estructurales al complejo IV, es razonable hipotetizar que el número de proteínas necesarias para su correcto ensamblaje será superior en humanos que en levaduras y que, por lo tanto, aún quedan por identificar muchas de las proteínas accesorias que intervienen en la formación de este complejo.

Drosophila melanogaster ha demostrado ser un organismo de una gran utilidad en la identificación de nuevas proteínas mitocondriales. En nuestro laboratorio el estudio de la expresión del gen *pol γ-β*, que codifica la subunidad accesoria de la ADN polimerasa γ, nos ha permitido identificar una de las tres subunidades de la glutamil ARNt^{Gln} amidotransferasa mitocondrial, GatC, que se encuentra codificada “upstream” del mismo. A su vez, el factor de transcripción mitocondrial mtTFB1 también se encuentra codificado en un mensajero bicistrónico junto con CCDC56, una proteína mitocondrial que, hasta este trabajo, presentaba una función desconocida.

A pesar de que esta disposición de dos genes en un mismo ARNm no es frecuente en eucariotas, un estudio comparativo del genoma de 12 especies de *Drosophila* ha identificado la presencia de más de un centenar de nuevos mensajeros policistrónicos en este organismo, que ocurren preferentemente en genes que codifican proteínas mitocondriales y metiltransferasas (Lin et al., 2007, Hayden and Bosco, 2008). Es tentador sugerir que la estructura bicistrónica típicamente procariota que encontramos en el mensajero *CCDC56/mtTFB1* de *Drosophila* fue transferida al núcleo desde el endosimbionte y es, por tanto, una reminiscencia de la estructura que presentaban estos dos genes en la proto-mitocondria. El factor de traducción mtTFB1 muy probablemente deriva de una dimetiltransferasa similar a KsgA del endosimbionte (Shutt and Gray, 2006b). Sin embargo, el hecho de no encontrar homólogos de CCDC56 en bacterias, hongos, plantas o levaduras parece apuntar a que el gen *CCDC56* apareció más tarde en la evolución y su localización junto con *mtTFB1* es una característica específica de insectos que permitiría la existencia de mecanismos de

regulación conjunta de ambos. En procariotas se ha observado que la organización de dos genes en un mismo ARNm favorece el mantenimiento de la estequiometría de los productos génicos y una regulación eficiente de la expresión de ambos, que frecuentemente se encuentran participando en los mismos procesos o rutas metabólicas (Blumenthal, 2004), sugiriendo que, al menos en *Drosophila*, las funciones del factor de traducción mitocondrial mtTFB1 y CCDC56 podrían estar relacionadas.

CCDC56 recibe el nombre de “*Coiled-Coil Domain Containing 56*” debido a que presenta un dominio “*Coiled-Coil*”. Estos dominios se caracterizan por la presencia de dos a cinco α -hélices enrolladas sobre sí mismas. La función fundamental de los dominios “*Coiled-Coil*” es la interacción entre proteínas, aunque se trata de un dominio muy versátil que permite a las proteínas desempeñar una gran variedad de funciones en la célula. De esta forma, se ha visto que este tipo de dominios se encuentra presente en factores de transcripción, moléculas señalizadoras, canales de iones o proteínas del citoesqueleto y la matriz extracelular (Burkhard et al., 2001, Lupas and Gruber, 2005). En la mitocondria se han identificado y caracterizado funcionalmente proteínas que presentan estos dominios “*Coiled-Coil*”, con funciones tan alejadas como CCDC44/TACO1, el activador de la traducción de COX1 (Weraarpachai et al., 2009), o CCDC109A/MCU, el uniportador de calcio de la mitocondria (Baughman et al., 2011, De Stefani et al., 2011).

Este trabajo nos ha permitido concluir que CCDC56 es una proteína mitocondrial no descrita anteriormente, esencial para la formación del complejo IV tanto en mosca como en células humanas, ratificando a *Drosophila* como un excelente sistema modelo para la búsqueda e identificación de nuevas proteínas mitocondriales.

2. CCDC56 es una nueva proteína integral de la membrana mitocondrial interna

Un primer paso a la hora de abordar la caracterización funcional de CCDC56 fue el estudio de su localización subcelular. Al comienzo de este proyecto no existían anticuerpos comerciales disponibles que reconocieran CCDC56 por lo que nos planteamos la generación de anticuerpos policlonales contra esta proteína. Las distintas inmunizaciones de conejos no generaron antiseros capaces de reconocer ninguna proteína del tamaño correspondiente a CCDC56.

A lo largo del desarrollo de este trabajo diversas empresas han puesto a disposición de los usuarios anticuerpos anti-CCDC56, pero en nuestras manos ninguno de ellos ha reconocido la proteína endógena mediante Western Blot en extractos de células HeLa. Asimismo, encargamos la generación de anticuerpos contra el dominio “*Coiled-Coil*” de CCDC56 pero, nuevamente, no logramos resultados positivos al utilizar en Western Blot ninguno de los antiseros obtenidos.

Por esta razón, para analizar en que compartimento celular se encuentra localizada esta proteína generamos una línea celular que sobreexpresaba de manera estable CCDC56 fusionada al epítipo Flag. La inmunocitoquímica mostró una colocalización perfecta de esta proteína con la mitocondria en células HeLa. Además del dominio “*Coiled-Coil*”, CCDC56 presenta un hipotético dominio transmembrana entre los aminoácidos 58 y 78. El fraccionamiento de las mitocondrias de la línea que sobreexpresa CCDC56-Flag confirmó este resultado, mostrando que CCDC56-Flag es una proteína integral de la membrana mitocondrial. Puesto que la construcción CCDC56-Flag complementa el fenotipo generado por la interferencia de CCDC56, podemos concluir además que la proteína marcada con el Flag sigue siendo funcional y su localización es la correcta.

Un gran número de los factores de ensamblaje de COX, como son SURF1, COX10, COX15, SCO1 o SCO2, son proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna. El papel que CCDC56 desempeña en el ensamblaje del complejo IV nos permite hipotetizar que esta proteína muy probablemente también se encuentra integrada en la membrana mitocondrial interna, aunque serán necesarios nuevos experimentos de fraccionamiento que confirmen en cuál de las dos membranas de la mitocondria se encuentra localizada esta proteína.

Las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo, como es el caso de CCDC56, son sintetizadas como precursores en los ribosomas citosólicos. La mayor parte de estos precursores poseen una presecuencia en su extremo N-terminal que dirige a la proteína hasta su destino final en la mitocondria. Una vez en el interior de la mitocondria unas peptidasas específicas se encargan del procesamiento proteolítico de las presecuencias para dar lugar a las proteínas maduras (Mossmann et al., 2011).

La transfección en células HeLa de HA-CCDC56 y CCDC56-Flag mostró que en las células que sobreexpresaban HA-CCDC56 coexistían dos formas distintas de esta proteína, una forma minoritaria de mayor tamaño detectada por los anticuerpos anti-HA y una forma de menor tamaño detectada por el antisuero anti-CCDC56. Este resultado se puede explicar si consideramos que CCDC56 tiene en su extremo amino una presecuencia de localización mitocondrial que es procesada al ser importada a la mitocondria. La cola de HA en el extremo amino terminal de la proteína estaría dificultando el procesamiento proteolítico de su presecuencia, explicándose así las dos formas distintas de CCDC56 que aparecen en las células que contienen la construcción HA-CCDC56.

Estos datos nos permiten concluir que CCDC56 es una proteína integral de la membrana mitocondrial que posee en su extremo amino una presecuencia de localización mitocondrial que es procesada al ser importada a la mitocondria para dar lugar a la proteína CCDC56 madura.

3. La disminución de CCDC56 provoca un déficit severo y aislado de la actividad complejo IV en la línea celular humana HeLa

Con objeto de estudiar la función de esta nueva proteína mitocondrial, en el laboratorio nos planteamos dos estrategias utilizando para ello *D. melanogaster* y la línea celular humana HeLa.

En un trabajo previo a esta tesis se generaron dos líneas “*knock-out*” en *D. melanogaster* ((Peralta et al., 2012), enviado a publicar). Las líneas con la deficiencia de CCDC56 no llegaban a completar su desarrollo, alcanzando únicamente el tercer estadio larvario. El principal fenotipo bioquímico que presentaban estas larvas era un déficit severo de la actividad de COX. Debido a que al generar las líneas KO se había eliminado el extremo 5' del ARNm y parte del promotor de *CCDC56/mtTFB1*, estas líneas presentaban junto con la falta de CCDC56 unos bajos niveles de expresión de *mtTFB1*. Esto unido a que CCDC56 no era capaz de rescatar totalmente la actividad del complejo IV, no permitía descartar que la disminución en el factor de traducción mtTFB1 estuviera también participando en el fenotipo de estas moscas.

Puesto que los resultados de las líneas KO de *Drosophila* señalaban a CCDC56 como una proteína fundamental para la actividad del complejo IV, procedimos a realizar un rastreo de las bases de datos que nos permitiera identificar la presencia de este gen en humanos. El análisis mediante BLAST mostró que CCDC56 se encuentra conservado desde *Drosophila* hasta humanos, y excepto en insectos se encuentra en una localización genómica distinta a *mtTFB1*. El hecho de que *CCDC56* en humanos no se encuentre codificado en un ARNm bicistrónico, nos permitió continuar su caracterización funcional mediante interferencia de ARN utilizando la línea celular humana HeLa. Para ello utilizamos tres siRNAs (Applied Biosystems) que reconocían de forma específica la región 3'UTR del mensajero de *CCDC56*. Estos siRNAs se utilizaron en experimentos de transfección transitoria en los que se obtenían muy bajos niveles del mensajero de *CCDC56* hasta las 96 horas de interferencia.

Como hemos comentado anteriormente, la mayor parte del ATP celular se produce en el interior de la mitocondria gracias a la fosforilación oxidativa mediante la oxidación de los cofactores reducidos procedentes de la glucólisis y el metabolismo de los ácidos grasos. La galactosa no es utilizada eficientemente como sustrato glucolítico, por lo que en estas condiciones únicamente son capaces de crecer aquellas células con una cadena respiratoria fisiológicamente funcional que les permita generar el ATP necesario para su crecimiento. Por esta razón, el análisis de la capacidad de las células de crecer en presencia de glucosa o de galactosa como fuente de carbono es una buena aproximación para conocer si presentan algún defecto del sistema OXPHOS. Las células interferidas no son capaces de crecer cuando se les suministra galactosa como fuente de carbono, por lo que podemos asumir que la deficiencia de CCDC56 está provocando una disminución en la producción de ATP. El déficit de CCDC56 es el causante además de un defecto, aunque no tan

acusado, del crecimiento de las células en medio con glucosa. El crecimiento más lento en medios con glucosa ya se ha observado en células con los “*knock-down*” de COX5b, subunidad estructural del complejo IV, (Galati et al., 2009) o de COX17, la chaperona de cobre implicada en la formación de los centros de cobre Cu_A y Cu_B (Oswald et al., 2009) indicando que es necesaria la presencia de un complejo IV plenamente funcional para la completa viabilidad de las células.

A continuación, analizamos si este defecto aparente de la producción de ATP que presentaban las células interferidas se debía a defectos en la actividad de alguno de los complejos de la cadena de respiratoria. Los resultados de actividad de los complejos mostraban una caída de la actividad del complejo IV en las células donde habíamos interferido *CCDC56*, mientras que la actividad de los complejos I, II y III no se encontraba afectada. Este defecto de la actividad del complejo IV es rescatado totalmente por la sobreexpresión de *CCDC56*-Flag indicando que es exclusivamente la ausencia de esta proteína la responsable del fenotipo.

Las medidas de actividad de los complejos de la cadena respiratoria en la interferencia de *CCDC56* apuntan a que es la ausencia de este gen y no la disminución de *mtTFB1* la causante del fenotipo de las líneas “*knock-out*” de *D. melanogaster*. Puesto que la interferencia de *CCDC56* en células HeLa en las que la expresión de *mtTFB1* no se encuentra afectada era capaz por sí sola de provocar una disminución de la actividad del complejo IV, es razonable pensar que la caída de COX observada en *Drosophila* se debe únicamente al “*knock-out*” de *CCDC56*. Además de la disminución de COX, en las líneas KO de *Drosophila* se había observado un aumento de la actividad de los complejos I, II y III de la cadena respiratoria así como del enzima citrato sintasa, marcador de la masa mitocondrial, que indican que puede estar teniendo lugar una respuesta compensatoria por parte del núcleo para paliar el defecto en la actividad del complejo IV. Este fenómeno ya se ha observado en otros mutantes mitocondriales en *Drosophila*, como por ejemplo las líneas en que se ha interferido el factor de transcripción *mtTFB2*, las cuales presentan un aumento de las actividades del complejo II y de la citrato sintasa (Adan et al., 2008). Este efecto compensatorio no se observa en la interferencia de *CCDC56* en células HeLa, bien porque no existan los mismos mecanismos de señalización retrógrada o quizás, más probablemente, porque el defecto causado por la caída de la actividad de COX no es tan acusado en el cultivo como para desencadenar esta respuesta.

Por otro lado, mediante experimentos de BN-PAGE observamos que la disminución de la actividad del complejo IV provocada por la interferencia de *CCDC56* en células HeLa iba acompañada de una caída similar en los niveles de complejo IV totalmente ensamblado. Al tratarse de experimentos de transfección transitoria en los que el grado de interferencia alcanzado en cada uno varía ligeramente, pudimos observar, además, que había una clara correlación entre los niveles de interferencia de *CCDC56*, la actividad del complejo IV y los niveles de complejo totalmente ensamblado en cada experimento. Estos resultados apuntan a que el complejo IV residual que presentan las células interferidas es totalmente activo y que la deficiencia de COX que observamos es debida a la incapacidad de estas células de ensamblar el holoenzima.

La caída del complejo IV totalmente ensamblado correlaciona con una caída similar en los niveles de las subunidades que lo componen. Las proteínas COX1, COX2, COX3 y COX4 se encuentran muy disminuidas en las células con la interferencia de *CCDC56*, aunque el grado de disminución es distinto para cada una de ellas. Estas diferencias se deben muy probablemente a la distinta estabilidad de cada una de las subunidades de COX, siendo aquellas más inestables las que presentan los niveles más bajos. De esta forma se puede explicar también que no se encuentren apenas afectados los niveles de COX5a, ya que esta proteína podría tener una mayor vida media y por tanto observamos una menor disminución de la misma.

La sobreexpresión de CCDC56-Flag en células HeLa no tenía ningún efecto en la actividad ni en la cantidad de complejo IV totalmente ensamblado, indicando que en condiciones normales los niveles de CCDC56 son limitantes para el proceso de formación del complejo IV. Estos datos están en coherencia con el hecho de que únicamente cuando se obtienen altos niveles de interferencia de *CCDC56* se puede observar el déficit del complejo IV, indicando que una ligera disminución de los niveles de esta proteína no afecta al proceso de formación de COX. Aunque la sobreexpresión en células generalmente no afectaba a la actividad del complejo IV, es necesario apuntar que en ciertos experimentos las células que sobreexpresaban CCDC56 presentaban una mayor actividad de COX y en estos casos también se observaba un aumento de las proteínas que forman el complejo, indicando que quizás en ciertas situaciones haya una mayor dependencia de esta proteína y su sobreexpresión puede hacer que aumente la biogénesis del complejo IV. Pese a que la interferencia de *CCDC56* no afectaba a la actividad del complejo III, su sobreexpresión provocaba un claro aumento de la actividad del mismo. Si bien este aumento de la actividad no va acompañado de un aumento de la cantidad de complejo III totalmente ensamblado. Las causas de la activación del complejo III en presencia de un aumento de CCDC56 son actualmente desconocidas.

Los déficits del complejo IV son uno de los defectos más comunes de la cadena respiratoria. Mutaciones en las subunidades estructurales del complejo o en cualquiera de las proteínas necesarias para su correcta formación son la causa de patologías muy severas. Hasta la fecha se han descrito mutaciones en los factores de ensamblaje SURF1 (Tiranti et al., 1998), COX10 (Valnot et al., 2000b), COX15 (Antonicka et al., 2003b), SCO1 (Valnot et al., 2000a), SCO2 (Papadopoulou et al., 1999) y C2orf64 (Huigsloot et al., 2011) y en el factor de traducción de COX1, TACO1 (Weraarpachai et al., 2009). Todas ellas tienen como consecuencia una drástica caída en la actividad y en los niveles de complejo IV totalmente ensamblado, fenotipo idéntico al observado en la deficiencia de CCDC56. Desde el momento en que aún se desconoce la causa genética de la mayor parte de las enfermedades causadas por defectos de COX, *CCDC56* es un excelente candidato para analizar y diagnosticar pacientes que presentan un déficit aislado de este complejo.

Por esta razón, una vez establecido que la deficiencia de CCDC56 era causante de una caída de la actividad del complejo IV, secuenciamos este gen en pacientes que presentaban un déficit del mismo. Se secuenció ADN procedente de 23 pacientes del Hospital 12 de Octubre de

Madrid facilitados por el grupo del Dr. Miguel Ángel Martín, de 2 pacientes del Hospital Clínic de Barcelona, facilitados por el Dr. Francesc Cardellach, y 13 pacientes más en el grupo del Dr. Massimo Zeviani (Instituto Carlo Besta, Milán), todos ellos con enfermedades mitocondriales causadas por un déficit aislado del complejo IV. Sin embargo, la secuenciación no reveló la presencia de mutaciones patogénicas en ninguno de ellos. Como se ha comentado anteriormente, las enfermedades mitocondriales son un grupo de enfermedades poco frecuentes que pueden estar causadas por mutaciones en cualquiera de los genes que afectan al funcionamiento del sistema OXPHOS, por lo que no es de extrañar que en un grupo tan reducido de pacientes no se hayan encontrado mutaciones patogénicas en *CCDC56*. No obstante, este gen es un excelente candidato para analizar en pacientes cuya enfermedad curse con un defecto del complejo IV.

4. *CCDC56* es una nueva proteína esencial para la formación del complejo IV en células humanas

La interferencia de *CCDC56* en células HeLa nos ha permitido concluir que cuando este gen se encuentra ausente se produce una caída de la cantidad de complejo IV ensamblado acompañada de una disminución de las proteínas que lo componen. Este comportamiento ya se había observado en pacientes con mutaciones en alguno de los factores de ensamblaje del complejo IV. Por esta razón nos planteamos que *CCDC56* podría estar participando en alguno de los pasos necesarios para que la formación de este complejo se produzca de forma adecuada.

Se puede considerar que el primer paso en la formación de los complejos de la cadena respiratoria es la síntesis de las subunidades que los componen. De las 13 subunidades que forman el complejo IV en humanos sólo tres de ellas, COX1, COX2 y COX3, se encuentran codificadas en el ADNmt y por lo tanto han de ser transcritas y traducidas por las maquinarias de transcripción y traducción de la mitocondria. Para ello, analizamos si la falta de *CCDC56* estaba afectando al nivel de los ARNm que codifican estas 3 subunidades de COX. Los resultados de la RT-PCR cuantitativa mostraron que *CCDC56* no afecta a la transcripción de estos tres mensajeros puesto que las células interferidas presentan niveles similares a los controles. Seguidamente analizamos la tasa de síntesis de las proteínas mitocondriales y su estabilidad mediante experimentos de pulso y caza (Chomyn, 1996). En ausencia de *CCDC56* se produce una ligera disminución en la tasa de síntesis de COX1 que va acompañada de una degradación más rápida de la proteína recién sintetizada.

No podemos descartar completamente que la disminución de la intensidad de la banda de COX1 que observamos en los experimentos de marcaje con pulsos de 30, 60 y 90 minutos de S³⁵-metionina se deba a una degradación muy rápida de la proteína recién sintetizada y no a un defecto combinado de la síntesis de COX1 y su estabilidad como proponemos. Sin embargo, el resultado de la cuantificación de los experimentos de caza en los que al retirar la S³⁵-Met únicamente se analiza

la estabilidad de las proteínas ya sintetizadas, no parece indicar que la degradación de COX1 sea tan rápida como la observada en los experimentos de pulso. Por lo tanto, estos datos apuntan a que la deficiencia de CCDC56 además de causar un defecto en la estabilidad de la proteína COX1 recién sintetizada, está provocando una ligera disminución de su síntesis. De esta forma, al sintetizarse una menor cantidad de COX1 que a su vez es degradada más rápidamente, observamos una mayor diferencia en la intensidad de COX1 entre las células interferidas y los controles cuando llevamos a cabo experimentos de pulso que cuando realizamos experimentos de caza.

A continuación nos planteamos analizar las posibles causas de la disminución en la estabilidad de la proteína COX1 recién sintetizada observada en los experimentos de pulso y caza. La degradación más rápida de COX1 podría explicarse si CCDC56 estuviera participando en la síntesis de sus cofactores Cu_B , hemo *a* o hemo *a*₃, o bien si estuviera participando en el ensamblaje del complejo IV, estabilizando los intermediarios de ensamblaje y facilitando la unión de las distintas subunidades para formar el holoenzima. En ambos casos una ausencia de CCDC56 impediría el ensamblaje del complejo y conduciría a la desestabilización de las subunidades que lo componen, explicando la rápida degradación de COX1 y los bajos niveles de COX2, COX3 y COX4 que observamos en las células interferidas.

Para analizar el papel que CCDC56 desempeña en la formación del complejo IV, en primer lugar analizamos la cinética de formación del mismo con objeto de comprobar si se encontraba afectada en las células interferidas. Para ello, tratamos las células durante dos días con el antibiótico cloranfenicol, inhibidor de la traducción de las proteínas mitocondriales, y posteriormente se dejó a las células recuperarse durante diferentes periodos de tiempo. Con este tratamiento conseguimos reducir los niveles de los complejos de la cadena respiratoria hasta casi su desaparición y la retirada el antibiótico nos permite analizar su dinámica de recuperación. El resultado de los geles de BN-PAGE mostró que en ausencia de CCDC56 apenas hay aparición de complejo IV ensamblado, confirmando así la implicación de esta proteína en la formación del mismo.

A continuación y puesto que en ausencia de CCDC56 no había formación del complejo IV, llevamos a cabo geles bidimensionales BN/SDS-PAGE, más sensibles para la detección de los subcomplejos. Estos geles nos permiten analizar el contenido y la distribución de las subunidades entre cada complejo y los intermediarios que aparecen durante su formación, pudiéndose en ocasiones observar la acumulación de los subcomplejos en caso de fallos en el ensamblaje (Calvaruso et al., 2008). Los geles bidimensionales mostraron que un déficit de CCDC56 está provocando un bloqueo en el ensamblaje del complejo IV. En las células interferidas se observa fundamentalmente la acumulación de un subcomplejo que contiene COX4 y coincide con el tamaño descrito para el subcomplejo S2 (Nijtmans et al., 1998). Se ha descrito que este subcomplejo se compone de COX1, COX4 y COX5a (Williams et al., 2004, Stiburek et al., 2009), y aunque no se observa tan claramente, COX1 y COX5a también parecen encontrarse presentes en el intermediario acumulado en las células deficientes para CCDC56. La acumulación del intermediario S2 en las células con la

deficiencia de *CCDC56* indica que el ensamblaje del complejo IV se encuentra bloqueado al menos parcialmente y no puede proseguir adecuadamente.

El primer paso en el ensamblaje de COX consiste en la inserción de COX1 en la membrana mitocondrial interna, formando el subcomplejo S1, al cual se unen los cofactores hemo *a*, hemo *a*₃ y Cu_B. Seguidamente se incorporan COX4 y COX5a, formando el segundo intermediario de ensamblaje, S2 (Nijtmans et al., 1998, Williams et al., 2004). Tras la formación del subcomplejo S2, COX2 unido a su grupo prostético Cu_A se incorpora al mismo, lo que desencadena una cascada rápida de incorporación de prácticamente todas las proteínas que forman el complejo, empezando por COX3, para dar lugar al subcomplejo S3 (Nijtmans et al., 1998). La acumulación del subcomplejo S2 que presentan las células con la deficiencia de *CCDC56* sugiere que en estas células el ensamblaje se encuentra bloqueado anteriormente a la entrada de COX2 y COX3.

El fenotipo que presentan las células en las condiciones de interferencia de *CCDC56* ya se ha observado anteriormente en pacientes que presentan mutaciones tanto en factores de ensamblaje como en subunidades estructurales de COX. Se ha descrito que el subcomplejo S2 se encuentra acumulado en pacientes que presentan mutaciones en COX3 (Tiranti et al., 2000). En estos pacientes la inserción de una citosina provoca un cambio en la fase de lectura de COX3 y la aparición de un codón de parada de la traducción prematuro. Como resultado, la proteína COX3 se encuentra ausente en estos pacientes acumulándose los intermediarios de ensamblaje anteriores a su incorporación e impidiendo la entrada al complejo de las subunidades nucleares que se incorporan tras ella. Del mismo modo, se ha observado que mutaciones en SCO1 y SCO2, proteínas responsables de la formación del centro de cobre Cu_A en COX2, tienen como resultado la acumulación del subcomplejo S2. En estos pacientes la falta de maduración del centro de cobre Cu_A impide la incorporación de COX2 al intermediario S2, produciéndose una acumulación del mismo (Leary et al., 2004).

Por otro lado, se ha observado una acumulación de los subcomplejos S2 y S1 en pacientes con mutaciones en el factor de ensamblaje SURF1 (Tiranti et al., 1999a, Coenen et al., 1999). La función de SURF1 en humanos es aún desconocida y se ha propuesto que podría facilitar la incorporación de COX2 al subcomplejo S2 (Tiranti et al., 1999a, Ugalde et al., 2002). Sin embargo, diversos estudios de los homólogos de SURF1 en bacterias han propuesto que esta proteína participa en la inserción del hemo *a* o la estabilización del centro hemo *a*₃-Cu_B (Smith et al., 2005), indicando en tal caso que la maduración de los grupos prostéticos de COX1 es esencial para que prosiga el ensamblaje del complejo IV.

El bloqueo en el ensamblaje de COX que observamos en las células con la deficiencia de *CCDC56* es similar al observado en pacientes con mutaciones en los factores de ensamblaje del complejo IV y nos indica que esta proteína desempeña un papel fundamental para la formación del mismo en células humanas. La acumulación del intermediario de ensamblaje S2 indica que *CCDC56* está implicada en las etapas iniciales de formación del complejo IV y sugiere que esta

proteína podría estar participando en el ensamblaje del complejo en los pasos previos a la entrada de COX2 y COX3, bien facilitando la entrada de estas dos proteínas o bien asegurando que el subcomplejo S2 se forma correctamente para permitir que prosiga el ensamblaje del complejo IV.

5. CCDC56 participa en la coordinación de la síntesis de COX1 con el ensamblaje del complejo IV

Para que el ensamblaje del complejo IV proceda de forma correcta las subunidades que lo forman deben encontrarse en la estequiometría adecuada. Para ello, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha desarrollado un mecanismo de regulación traduccional de la síntesis de Cox1 que se encuentra acoplado al ensamblaje de COX. De esta manera cualquier bloqueo en la formación del complejo provoca la disminución de la síntesis de Cox1, asegurando una adecuada tasa de síntesis e impidiendo así la acumulación de subunidades e intermediarios de ensamblaje (Mick et al., 2011, Soto et al., 2011).

S. cerevisiae cuenta con una proteína conocida como Mss51 (*“Mitochondrial Splicing Supresor 51”*) que, además de interactuar con el ARNm de Cox1 activando su traducción, se une a la proteína recién sintetizada confiriéndole estabilidad y facilitando su ensamblaje con el resto de proteínas del complejo IV (Perez-Martinez et al., 2003). La dualidad de funciones de esta proteína hace de ella la pieza clave del sistema regulatorio de la síntesis de Cox1 (Figura 37)

En la membrana mitocondrial interna de *S. cerevisiae* se encuentran dos pequeñas proteínas llamadas Cox14 y Cox25/Coa3 que interactúan con la proteína Cox1 recién sintetizada estabilizando el complejo Cox1-Mss51 (Mick et al., 2010, Fontanesi et al., 2011). La topología de estas proteínas sugiere que podrían estar interactuando con los dominios transmembrana de Cox1 facilitando su inserción en la membrana mitocondrial interna (Soto et al., 2011). La estabilización del complejo Cox1-Mss51 por la unión de Cox14 y Cox25/Coa3, impide que Mss51 esté disponible para activar la traducción del ARNm de Cox1.

El mecanismo encargado de la liberación de Mss51 es aún poco conocido. Se ha propuesto que la unión de Coa1 al complejo Cox1-Mss51-Cox14-Cox25 promueve el reclutamiento de Shy1, homólogo de SURF1 en levaduras, y la liberación de Mss51 (Mick et al., 2007, Pierrel et al., 2007). De esta forma, el complejo Cox1-Cox14-Cox25-Coa1-Shy1 prosigue el proceso de ensamblaje con la incorporación de las subunidades nucleares Cox5 y Cox6 y la proteína Mss51 se encontraría disponible para nuevas rondas de traducción de Cox1.

De este modo *S. cerevisiae* consigue que los niveles de Mss51 disponibles para activar la síntesis de Cox1 estén limitados por la cantidad de Mss51 que se encuentra secuestrada formando parte de los intermediarios del ensamblaje de COX. Así, cualquier bloqueo en el ensamblaje del complejo

IV tendrá como resultado que Mss51 quede retenido en estos subcomplejos y consecuentemente se producirá una disminución en la síntesis de Cox1, impidiendo la acumulación de los intermediarios de ensamblaje (Perez-Martinez et al., 2009). Se ha descrito que ciertos intermediarios de COX pueden actuar como oxidantes, por lo que este mecanismo le impediría a la levadura además evitar el estrés oxidativo cuando se encuentra bloqueado el ensamblaje del complejo (Khalimonchuk et al., 2007).

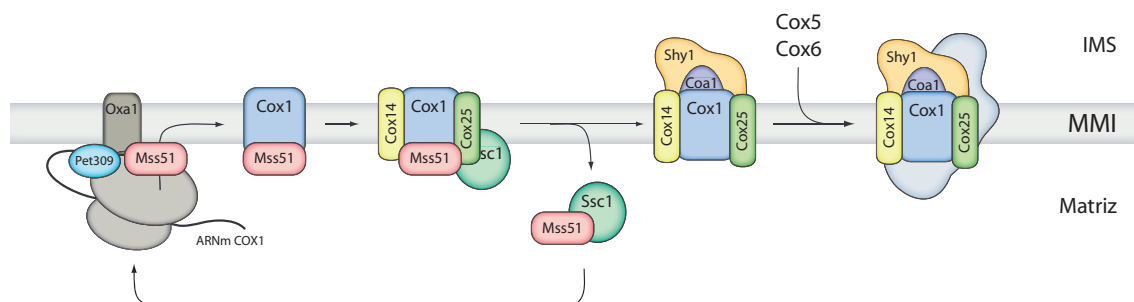


Figura 37. La síntesis de Cox1 y el ensamblaje de COX se encuentran acoplados en *Saccharomyces cerevisiae*. Cox1 es sintetizada en los ribosomas mitocondriales tras la activación de su traducción por Pet309 y Mss51. Mss51 interacciona con la proteína Cox1 recién sintetizada y su unión es estabilizada por las proteínas Cox14 y Cox25. La unión de Coa1 al complejo Cox1-Mss51-Cox14-Cox25 promueve el reclutamiento de Shy1 y la liberación de Mss51, que se encuentra así disponible para nuevas rondas de traducción del mensajero de Cox1. La chaperona mitocondrial Ssc1 de la familia Hsp70 (*Heat Shock Protein 70*) interacciona con Mss51 y podría coordinar las funciones de Mss51 en traducción y en el ensamblaje del complejo IV. Adaptado de (Mick et al., 2011) y (Soto et al., 2011).

En humanos aún no se ha caracterizado ningún mecanismo que permita la regulación conjunta de la síntesis de las proteínas que componen el complejo IV y su ensamblaje. Sin embargo, un trabajo reciente del grupo de E. Shoubridge sugiere la existencia de un acoplamiento de la síntesis de COX1 y el ensamblaje del complejo IV, similar al mecanismo presente en levaduras (Weraarpachai et al., 2012).

En este trabajo se identificaron mutaciones en el gen *C12orf62* en un paciente neonato con acidosis láctica fatal. C12orf62 es una proteína integral de la membrana mitocondrial de 6 KDa que se encuentra presente únicamente en vertebrados. Los pacientes con mutaciones en *C12orf62* presentaban una reducción de la actividad de COX y de los niveles de complejo totalmente ensamblado, que iban acompañados de una disminución en los niveles de las subunidades COX1, COX2 y COX4, apuntando a un defecto en el ensamblaje del complejo IV. El análisis mediante geles bidimensionales mostró que las células del paciente presentaban un defecto en la incorporación de COX2 y COX3 al complejo IV, indicando que se trata de una nueva proteína necesaria para su ensamblaje. Asimismo, mediante ensayos de pulso y caza, se observó que las células del paciente presentaban una disminución de la tasa de síntesis de COX1.

La inmunoprecipitación de C12orf62 reveló que esta proteína interacciona por un lado con COX1, COX2 y COX4, apoyando su función como factor de ensamblaje del complejo IV, y por

otro lado con el factor de elongación de la traducción EFTu y las proteínas LRPPRC y SLIRP. LRPPRC y SLIRP forman un complejo ribonucleoproteico junto con los mensajeros mitocondriales maduros que es esencial para su estabilidad, especialmente para la de los ARNm de COX1, COX2 y COX3 (Sasarmann et al., 2010, Ruzzenente et al., 2011). Esta interacción de C12orf62 con proteínas implicadas en la traducción y estabilidad de los mensajeros apoya su participación en la traducción de COX1.

La participación de C12orf62 en el ensamblaje del COX y en la traducción del ARNm de COX1, lleva a los autores a proponer que esta proteína está participando en la coordinación de la síntesis de COX1 con el ensamblaje del complejo IV de un modo similar al descrito en levadura, siendo este trabajo la primera evidencia experimental que sugiere la existencia de este mecanismo en células humanas.

Hasta la fecha no se han identificado otras proteínas que pudieran estar implicadas en este nuevo mecanismo de regulación, no obstante, los resultados obtenidos con el silenciamiento de *CCDC56* apuntan a que esta proteína también forma parte de este circuito regulatorio junto con C12orf62. Como se ha discutido anteriormente, *CCDC56* es esencial para conseguir niveles adecuados de marcaje de COX1 en los experimentos de pulso indicando que la presencia de esta proteína es necesaria para su síntesis y, por otro lado, las células con la interferencia de *CCDC56* presentan un defecto en el ensamblaje del complejo IV, encontrándose éste bloqueado en los pasos previos a la entrada de COX2 y COX3 al complejo, al igual que ocurre en los pacientes con mutaciones en C12orf62. Los defectos de síntesis de COX1 y bloqueo del ensamblaje del complejo IV causados por la interferencia de *CCDC56* apoyan fuertemente la existencia de un acoplamiento de la traducción de COX1 con el ensamblaje del complejo IV también en células humanas.

CCDC56 en condiciones nativas se encuentra formando varios complejos de alto peso molecular, pudiéndose tratar de diversos intermediarios del ensamblaje de COX o bien parte de la maquinaria de traducción. Los datos obtenidos en este trabajo no nos han permitido identificar a las proteínas que interaccionan con *CCDC56*, lo que hace necesario llevar a cabo nuevos experimentos de inmunoprecipitación ya que la identificación de estas proteínas nos permitirá conocer la función que *CCDC56* desempeña en la formación del complejo IV y su coordinación con la síntesis de COX1.

De un modo similar a las proteínas de levadura Mss51, Cox14 o Cox25/Coa3, *CCDC56* podría encontrarse formando parte de subcomplejos en los que se encuentra presente la proteína COX1 recién sintetizada facilitando su ensamblaje con el resto de subunidades del complejo IV. Esta unión estaría impidiendo que o bien C12orf62, bien tanto C12orf62 como *CCDC56* o bien alguna otra proteína aún sin identificar interaccionaran con la maquinaria de traducción para activar la síntesis de COX1. Si el ensamblaje del COX prosigue normalmente, estas proteínas se liberarán de los subcomplejos y estarán disponibles para ejercer su función nuevamente como activadores de la traducción (Figura 38A).

Alternativamente, CCDC56 podría desempeñar una función similar a la proteína Coa1 de *S. cerevisiae*. La interacción de CCDC56 con los intermediarios del ensamblaje de COX permitiría la entrada de COX2 y COX3 al complejo y la liberación del mismo de C12orf62 u otros posibles activadores de la traducción de COX1. En esta situación, la ausencia de CCDC56 dificultaría el ensamblaje del complejo, acumulándose subcomplejos en los que podrían quedar secuestrados C12orf62 u otros factores de traducción de COX1 produciéndose así la caída en su síntesis (Figura 38B).

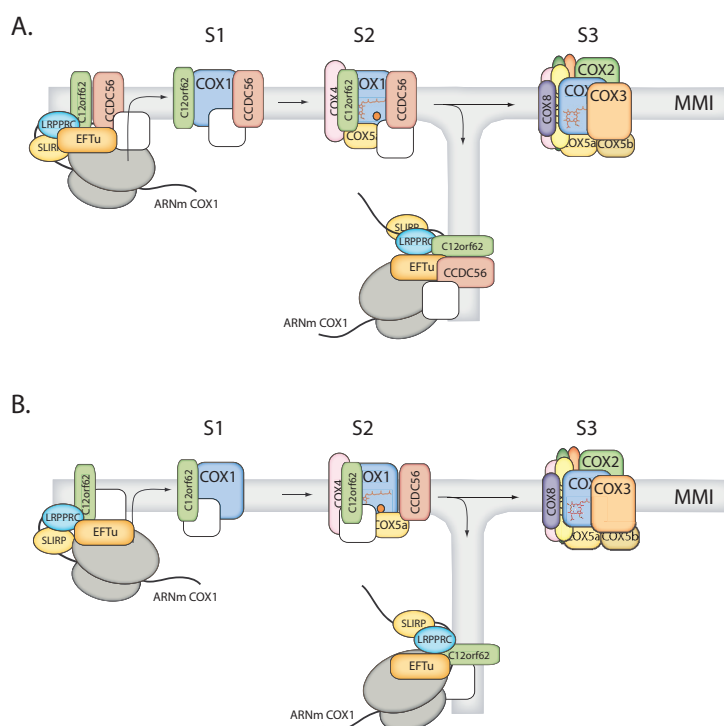


Figura 38. Representación esquemática de los posibles mecanismos de acoplamiento de la traducción de COX1 y el ensamblaje del complejo IV en humanos. A) CCDC56 podría interaccionar con la proteína COX1 recién sintetizada facilitando su ensamblaje con el resto de subunidades del complejo IV. En estos complejos se encuentran secuestrados C12orf62, CCDC56 u otros posibles activadores de la traducción de COX1 (representados como un cuadrado blanco). **B)** La interacción de CCDC56 con los intermediarios del ensamblaje de COX permitiría la entrada de COX2 y COX3 al complejo y la liberación del mismo de C12orf62 u otros posibles activadores de la traducción de COX1 (representados como un cuadrado blanco).

La mayor parte de las proteínas de *S. cerevisiae* encargadas del acoplamiento de la síntesis de COX1 y el ensamblaje del complejo IV no presentan homólogos en humanos (Soto et al., 2011) y a su vez, CCDC56 y C12orf62 no se encuentran presentes en *S. cerevisiae*, sugiriendo que los vertebrados han desarrollado un nuevo circuito regulatorio que les permite llevar a cabo una función muy similar a la de la levadura. La existencia de este mecanismo sería muy relevante para la formación del complejo IV. COX1 es subunidad central del complejo y la primera en incorporarse al proceso de ensamblaje, por lo que la regulación de su síntesis asegura la regulación del proceso de ensamblaje del complejo y así adecuarlo a las necesidades de la célula.

CONCLUSIONES

1. El factor de traducción mitocondrial mtTFB1 de *Drosophila melanogaster* se encuentra codificado en un mensajero bicistrónico junto con CCDC56 (*“Coiled-coil domain containing 56”*) una proteína altamente conservada en la escala evolutiva.
2. El gen *CCDC56* humano codifica una pequeña proteína integral de la membrana mitocondrial de aproximadamente 12 KDa. Esta proteína presenta una presecuencia de localización mitocondrial que es procesada al ser importada al interior del orgánulo.
3. El silenciamiento transitorio de *CCDC56* en la línea celular humana HeLa provoca un déficit aislado de la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria acompañado de una disminución equivalente en la cantidad de complejo totalmente ensamblado y de las subunidades que lo componen.
4. El silenciamiento de *CCDC56* no afecta a los niveles de los ARN mensajeros mitocondriales, pero produce una disminución en la tasa de síntesis de COX1 y una rápida degradación de la proteína recién sintetizada.
5. El silenciamiento de *CCDC56* en la línea celular humana HeLa produce un bloqueo en el ensamblaje del complejo IV de la cadena respiratoria, acumulándose en estas células un intermediario de ensamblaje cuyo tamaño coincide con el del subcomplejo S2, que contiene al menos COX4. Aunque no se observa de forma tan evidente, también contiene COX1 y COX5a.
6. La sobreexpresión de *CCDC56*-Flag no tiene ningún efecto en la actividad del complejo IV, en la cantidad de complejo totalmente ensamblado ni en la cantidad de las subunidades que lo componen. Además, la proteína *CCDC56*-Flag rescata totalmente la caída de la actividad de COX causada por el silenciamiento de *CCDC56*.
7. *CCDC56*-Flag en condiciones nativas se encuentra formando parte de varios complejos de alto peso molecular, lo que indica su interacción con otras proteínas.
8. La secuenciación de ADN procedente de 38 pacientes que presentan un defecto aislado en la actividad del complejo IV no ha revelado la presencia de mutaciones patogénicas en ninguno de ellos.

BIBLIOGRAFÍA

ACIN-PEREZ, R., FERNANDEZ-SILVA, P., PELEATO, M. L., PEREZ-MARTOS, A. & ENRIQUEZ, J. A. 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*, 32, 529-39.

ADAN, C., MATSUSHIMA, Y., HERNANDEZ-SIERRA, R., MARCO-FERRERES, R., FERNANDEZ-MORENO, M. A., GONZALEZ-VIOQUE, E., CALLEJA, M., ARAGON, J. J., KAGUNI, L. S. & GARESSE, R. 2008. Mitochondrial transcription factor B2 is essential for metabolic function in *Drosophila melanogaster* development. *J Biol Chem*, 283, 12333-42.

ANTONICKA, H., LEARY, S. C., GUERCIN, G. H., AGAR, J. N., HORVATH, R., KENNAWAY, N. G., HARDING, C. O., JAKSCH, M. & SHOUBRIDGE, E. A. 2003a. Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Mol Genet*, 12, 2693-702.

ANTONICKA, H., MATTMAN, A., CARLSON, C. G., GLERUM, D. M., HOFFBUHR, K. C., LEARY, S. C., KENNAWAY, N. G. & SHOUBRIDGE, E. A. 2003b. Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, 72, 101-14.

ARCO, A. D. & SATRUSTEGUI, J. 2005. New mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2204-27.

BANCI, L., BERTINI, I., CIOFI-BAFFONI, S., HADJILOI, T., MARTINELLI, M. & PALUMAA, P. 2008. Mitochondrial copper(I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 6803-8.

BARRIENTOS, A., GOUGET, K., HORN, D., SOTO, I. C. & FONTANESI, F. 2009. Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: insights into the COX assembly process. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 97-107.

BAUGHMAN, J. M., PEROCCHI, F., GIRGIS, H. S., PLOVANICH, M., BELCHERTIMME, C. A., SANCAK, Y., BAO, X. R., STRITTMATTER, L., GOLDBERGER, O., BOGORAD, R. L., KOTELIANSKY, V. & MOOTHA, V. K. 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 341-5.

BELEVICH, I., VERKHOVSKY, M. I. & WIKSTROM, M. 2006. Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase. *Nature*, 440, 829-32.

BLUMENTHAL, T. 2004. Operons in eukaryotes. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 3, 199-211.

BOGENHAGEN, D. & CLAYTON, D. A. 1977. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*, 11, 719-27.

BONNEFOY, N., KERMORGANT, M., GROUDINSKY, O., MINET, M., SLONIMSKI, P. P. & DUJARDIN, G. 1994. Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an oxa1- mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11978-82.

BURKHARD, P., STETEFELD, J. & STRELKOV, S. V. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*, 11, 82-8.

CALVARUSO, M. A., SMEITINK, J. & NIJTMANS, L. 2008. Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods*, 46, 281-7.

CALVO, S. E. & MOOTHA, V. K. 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 11, 25-44.

CARRODEGUAS, J. A., KOBAYASHI, R., LIM, S. E., COPELAND, W. C. & BOGENHAGEN, D. F. 1999. The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol*, 19, 4039-46.

CELOTTO, A. M., FRANK, A. C., MCGRATH, S. W., FERGESTAD, T., VAN VOORHIES, W. A., BUTTLE, K. F., MANNELLA, C. A. & PALLADINO, M. J. 2006. Mitochondrial encephalomyopathy in *Drosophila*. *J Neurosci*, 26, 810-20.

CLARK, A. G., EISEN, M. B., SMITH, D. R., BERGMAN, C. M., OLIVER, B., MARKOW, T. A., KAUFMAN, T. C., KELLIS, M., GELBART, W., IYER, V. N., POLLARD, D. A., SACKTON, T. B., LARRACUENTE, A. M., SINGH, N. D., ABAD, J. P., ABT, D. N., ADRYAN, B., AGUADE, M., AKASHI, H., ANDERSON, W. W., AQUADRO, C. F., ARDELL, D. H., ARGUELLO, R., ARTIERI, C. G., BARBASH, D. A., BARKER, D., BARSANTI, P.,

BATTERHAM, P., BATZOGLOU, S., BEGUN, D., BHUTKAR, A., BLANCO, E., BOSAK, S. A., BRADLEY, R. K., BRAND, A. D., BRENT, M. R., BROOKS, A. N., BROWN, R. H., BUTLIN, R. K., CAGGESE, C., CALVI, B. R., BERNARDO DE CARVALHO, A., CASPI, A., CASTREZANA, S., CELNIKER, S. E., CHANG, J. L., CHAPPLE, C., CHATTERJI, S., CHINWALLA, A., CIVETTA, A., CLIFTON, S. W., COMERON, J. M., COSTELLO, J. C., COYNE, J. A., DAUB, J., DAVID, R. G., DELCHER, A. L., DELEHAUNTY, K., DO, C. B., EBLING, H., EDWARDS, K., EICKBUSH, T., EVANS, J. D., FILIPSKI, A., FINDEISS, S., FREYHULT, E., FULTON, L., FULTON, R., GARCIA, A. C., GARDINER, A., GARFIELD, D. A., GARVIN, B. E., GIBSON, G., GILBERT, D., GNERRE, S., GODFREY, J., GOOD, R., GOTEA, V., GRAVELY, B., GREENBERG, A. J., GRIFFITHS-JONES, S., GROSS, S., GUIGO, R., GUSTAFSON, E. A., HAERTY, W., HAHN, M. W., HALLIGAN, D. L., HALPERN, A. L., HALTER, G. M., HAN, M. V., HEGER, A., HILLIER, L., HINRICHS, A. S., HOLMES, I., HOSKINS, R. A., HUBISZ, M. J., HULTMARK, D., HUNTLEY, M. A., JAFFE, D. B., JAGADEESHAN, S., et al. 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450, 203-18.

CLARK, K. M., TAYLOR, R. W., JOHNSON, M. A., CHINNERY, P. F., CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. M., ANDREWS, R. M., NELSON, I. P., WOOD, N. W., LAMONT, P. J., HANNA, M. G., LIGHTOWLERS, R. N. & TURNBULL, D. M. 1999. An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome C oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. *Am J Hum Genet*, 64, 1330-9.

COBINE, P. A., PIERREL, F., LEARY, S. C., SASARMAN, F., HORNG, Y. C., SHOUBRIDGE, E. A. & WINGE, D. R. 2006. The P174L mutation in human Sco1 severely compromises Cox17-dependent metallation but does not impair copper binding. *J Biol Chem*, 281, 12270-6.

COENEN, M. J., VAN DEN HEUVEL, L. P., NIJTMANS, L. G., MORAVA, E., MARQUARDT, I., GIRSCHICK, H. J., TRIJBELS, F. J., GRIVELL, L. A. & SMEITINK, J. A. 1999. SURFEIT-1 gene analysis and two-dimensional blue native gel electrophoresis in cytochrome c oxidase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, 265, 339-44.

COENEN, M. J., VAN DEN HEUVEL, L. P., UGALDE, C., TEN BRINKE, M., NIJTMANS, L. G., TRIJBELS, F. J., BEBLO, S., MAIER, E. M., MUNTAU, A. C. & SMEITINK, J. A. 2004. Cytochrome c oxidase biogenesis in a patient with a mutation in COX10 gene. *Ann Neurol*, 56, 560-4.

COMI, G. P., BORDONI, A., SALANI, S., FRANCESCHINA, L., SCIACCO, M., PRELLE, A., FORTUNATO, F., ZEVIANI, M., NAPOLI, L., BRESOLIN, N., MOGGIO, M., AUSENDA, C. D., TAANMAN, J. W. & SCARLATO, G. 1998. Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol*, 43, 110-6.

COTNEY, J. & SHADEL, G. S. 2006. Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2. *J Mol Evol*, 63, 707-17.

CHAN, D. C. 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 79-99.

CHOMYN, A. 1996. In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol*, 264, 197-211.

DAVIES, S. M., RACKHAM, O., SHEARWOOD, A. M., HAMILTON, K. L., NARSAI, R., WHELAN, J. & FILIPOVSKA, A. 2009. Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. *FEBS Lett*, 583, 1853-8.

DE STEFANI, D., RAFFAELLO, A., TEARDO, E., SZABO, I. & RIZZUTO, R. 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 336-40.

DIAZ, F. 2010. Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 100-10.

DIAZ, F., KOTARSKY, H., FELLMAN, V. & MORAES, C. T. 2011. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med*, 16, 197-204.

FALKENBERG, M., GASPARI, M., RANTANEN, A., TRIFUNOVIC, A., LARSSON, N. G. & GUSTAFSSON, C. M. 2002. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*, 31, 289-94.

FERNANDEZ-MORENO, M. A., BORNSTEIN, B., PETTT, N. & GARESSE, R. 2000. The pathophysiology of mitochondrial biogenesis: towards four decades of mitochondrial DNA research. *Mol Genet Metab*, 71, 481-95.

FERNANDEZ-SILVA, P., ENRIQUEZ, J. A. & MONTOYA, J. 2003. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*, 88, 41-56.

FERNANDEZ-VIZARRA, E., ENRIQUEZ, J. A., PEREZ-MARTOS, A., MONTOYA, J. & FERNANDEZ-SILVA, P. 2011. Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion*, 11, 207-13.

FERNANDEZ-VIZARRA, E., LOPEZ-PEREZ, M. J. & ENRIQUEZ, J. A. 2002. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods*, 26, 292-7.

FERNANDEZ-VIZARRA, E., TIRANTI, V. & ZEVIANI, M. 2009. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 200-11.

FONTANESI, F., CLEMENTE, P. & BARRIENTOS, A. 2011. Cox25 teams up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to regulate mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 expression and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 286, 555-66.

FONTANESI, F., SOTO, I. C., HORN, D. & BARRIENTOS, A. 2006. Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1129-47.

GABALDON, T. & HUYNEN, M. A. 2007. From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism. *PLoS Comput Biol*, 3, e219.

GALATI, D., SRINIVASAN, S., RAZA, H., PRABU, S. K., HARDY, M., CHANDRAN, K., LOPEZ, M., KALYANARAMAN, B. & AVADHANI, N. G. 2009. Role of nuclear-encoded subunit Vb in the assembly and stability of cytochrome c oxidase complex: implications in mitochondrial dysfunction and ROS production. *Biochem J*, 420, 439-49.

GARESSE, R. & KAGUNI, L. S. 2005. A *Drosophila* model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation. *IUBMB Life*, 57, 555-61.

GARESSE, R. & VALLEJO, C. G. 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*, 263, 1-16.

GARRIDO, N., GRIPARIC, L., JOKITALO, E., WARTIOVAARA, J., VAN DER BLIEK, A. M. & SPELBRINK, J. N. 2003. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell*, 14, 1583-96.

GASPARI, M., FALKENBERG, M., LARSSON, N. G. & GUSTAFSSON, C. M. 2004. The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *EMBO J*, 23, 4606-14.

GATTERMANN, N., RETZLAFF, S., WANG, Y. L., HOFHAUS, G., HEINISCH, J., AUL, C. & SCHNEIDER, W. 1997. Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Blood*, 90, 4961-72.

GHEZZI, D., ARZUFFI, P., ZORDAN, M., DA RE, C., LAMPERTI, C., BENNA, C., D'ADAMO, P., DIODATO, D., COSTA, R., MARIOTTI, C., UZIEL, G., SMIDERLE, C. & ZEVIANI, M. 2011. Mutations in *TTC19* cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nat Genet*, 43, 259-63.

GRANT, J., SALDANHA, J. W. & GOULD, A. P. 2010. A *Drosophila* model for primary coenzyme Q deficiency and dietary rescue in the developing nervous system. *Dis Model Mech*, 3, 799-806.

GRAY, M. W., BURGER, G. & LANG, B. F. 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol*, 2, REVIEWS1018.

GROHMANN, K., AMAIRIC, F., CREWS, S. & ATTARDI, G. 1978. Failure to detect "cap" structures in mitochondrial DNA-coded poly(A)-containing RNA from HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, 5, 637-51.

HAMMARSUND, M., WILSON, W., CORCORAN, M., MERUP, M., EINHORN, S., GRANDER, D. & SANGFELT, O. 2001. Identification and characterization of two novel human mitochondrial elongation factor genes, hEFG2 and hEFG1, phylogenetically conserved through evolution. *Hum Genet*, 109, 542-50.

HANNAPPEL, A., BUNDSCHUH, F. A. & LUDWIG, B. 2011. Characterization of heme-binding properties of *Paracoccus denitrificans* Surf1 proteins. *FEBS J*, 278, 1769-78.

HAYDEN, C. A. & BOSCO, G. 2008. Comparative genomic analysis of novel conserved peptide upstream open reading frames in *Drosophila melanogaster* and other dipteran species. *BMC Genomics*, 9, 61.

HISER, L., DI VALENTIN, M., HAMER, A. G. & HOSLER, J. P. 2000. Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*, 275, 619-23.

HORNG, Y. C., COBINE, P. A., MAXFIELD, A. B., CARR, H. S. & WINGE, D. R. 2004. Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem*, 279, 35334-40.

HORNG, Y. C., LEARY, S. C., COBINE, P. A., YOUNG, F. B., GEORGE, G. N., SHOUBRIDGE, E. A. & WINGE, D. R. 2005. Human Sco1 and Sco2 function as copper-binding proteins. *J Biol Chem*, 280, 34113-22.

HUIGSLOOT, M., NIJTMANS, L. G., SZKLARCZYK, R., BAARS, M. J., VAN DEN BRAND, M. A., HENDRIKSFRANSSEN, M. G., VAN DEN HEUVEL, L. P., SMEITINK, J. A., HUYNEN, M. A. & RODENBURG, R. J. 2011. A mutation in C2orf64 causes impaired cytochrome c oxidase assembly and mitochondrial cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, 88, 488-93.

HUTCHISON, C. A., 3RD, NEWBOLD, J. E., POTTER, S. S. & EDGELL, M. H. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251, 536-8.

JASTROCH, M., DIVAKARUNI, A. S., MOOKERJEE, S., TREBERG, J. R. & BRAND, M. D. 2010. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*, 47, 53-67.

- JIA, L., DIENHART, M., SCHRAMP, M., MCCAULEY, M., HELL, K. & STUART, R. A. 2003. Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J*, 22, 6438-47.
- KAGUNI, L. S. 2004. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem*, 73, 293-320.
- KANKI, T., OHGAKI, K., GASPARI, M., GUSTAFSSON, C. M., FUKUOH, A., SASAKI, N., HAMASAKI, N. & KANG, D. 2004. Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol*, 24, 9823-34.
- KELLY, D. P. & SCARPULLA, R. C. 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*, 18, 357-68.
- KHALIMONCHUK, O., BIRD, A. & WINGE, D. R. 2007. Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 282, 17442-9.
- KOC, E. C. & SPREMULLI, L. L. 2002. Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs. *J Biol Chem*, 277, 35541-9.
- KORHONEN, J. A., GASPARI, M. & FALKENBERG, M. 2003. TWINKLE Has 5' -> 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem*, 278, 48627-32.
- KORHONEN, J. A., PHAM, X. H., PELLEGRINI, M. & FALKENBERG, M. 2004. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J*, 23, 2423-9.
- KUKAT, C., WURM, C. A., SPAHR, H., FALKENBERG, M., LARSSON, N. G. & JAKOBS, S. 2011. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 13534-9.
- KURLAND, C. G. & ANDERSSON, S. G. 2000. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 786-820.
- LARSSON, N. G., WANG, J., WILHELMSSON, H., OLDFORS, A., RUSTIN, P., LEWANDOSKI, M., BARSH, G. S. & CLAYTON, D. A. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*, 18, 231-6.
- LEARY, S. C. 2010. Redox regulation of SCO protein function: controlling copper at a mitochondrial crossroad. *Antioxid Redox Signal*, 13, 1403-16.
- LEARY, S. C., KAUFMAN, B. A., PELLECCIA, G., GUERCIN, G. H., MATTMAN, A., JAKSCH, M. & SHOUBRIDGE, E. A. 2004. Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet*, 13, 1839-48.

LEARY, S. C., SASARMAN, F., NISHIMURA, T. & SHOUBRIDGE, E. A. 2009. Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. *Hum Mol Genet*, 18, 2230-40.

LEE, S., KIM, S., SUN, X., LEE, J. H. & CHO, H. 2007. Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 357, 111-7.

LEFAI, E., CALLEJA, M., RUIZ DE MENA, I., LAGINA, A. T., 3RD, KAGUNI, L. S. & GARESSE, R. 2000. Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase gamma results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, 264, 37-46.

LI, Y., PARK, J. S., DENG, J. H. & BAI, Y. 2006. Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J Bioenerg Biomembr*, 38, 283-91.

LIN, M. F., CARLSON, J. W., CROSBY, M. A., MATTHEWS, B. B., YU, C., PARK, S., WAN, K. H., SCHROEDER, A. J., GRAMATES, L. S., ST PIERRE, S. E., ROARK, M., WILEY, K. L., JR., KULATHINAL, R. J., ZHANG, P., MYRICK, K. V., ANTONE, J. V., CELNIKER, S. E., GELBART, W. M. & KELLIS, M. 2007. Revisiting the protein-coding gene catalog of *Drosophila melanogaster* using 12 fly genomes. *Genome Res*, 17, 1823-36.

LING, M., MERANTE, F., CHEN, H. S., DUFF, C., DUNCAN, A. M. & ROBINSON, B. H. 1997. The human mitochondrial elongation factor tu (EF-Tu) gene: cDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene. *Gene*, 197, 325-36.

LITONIN, D., SOLOGUB, M., SHI, Y., SAVKINA, M., ANIKIN, M., FALKENBERG, M., GUSTAFSSON, C. M. & TEMIAKOV, D. 2010. Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *J Biol Chem*, 285, 18129-33.

LIU, M. & SPREMULLI, L. 2000. Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem*, 275, 29400-6.

LONGEN, S., BIEN, M., BIHLMAIER, K., KLOEPPEL, C., KAUFF, F., HAMMERMEISTER, M., WESTERMANN, B., HERRMANN, J. M. & RIEMER, J. 2009. Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *J Mol Biol*, 393, 356-68.

LONGLEY, M. J., PRASAD, R., SRIVASTAVA, D. K., WILSON, S. H. & COPELAND, W. C. 1998. Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12244-8.

LUPAS, A. N. & GRUBER, M. 2005. The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem*, 70, 37-78.

MA, L. & SPREMULLI, L. L. 1995. Cloning and sequence analysis of the human mitochondrial translational initiation factor 2 cDNA. *J Biol Chem*, 270, 1859-65.

MAIER, D., FARR, C. L., POECK, B., ALAHARI, A., VOGEL, M., FISCHER, S., KAGUNI, L. S. & SCHNEUWLY, S. 2001. Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell*, 12, 821-30.

MAMMUCARI, C., PATRON, M., GRANATIERO, V. & RIZZUTO, R. 2011. Molecules and roles of mitochondrial calcium signaling. *Biofactors*, 37, 219-27.

MANFREDI, G., SCHON, E. A., MORAES, C. T., BONILLA, E., BERRY, G. T., SLADKY, J. T. & DIMAURO, S. 1995. A new mutation associated with MELAS is located in a mitochondrial DNA polypeptide-coding gene. *Neuromuscul Disord*, 5, 391-8.

MARGULIS, L. 1975. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.

MARTINEZ-DIEZ, M., SANTAMARIA, G., ORTEGA, A. D. & CUEZVA, J. M. 2006. Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *PLoS One*, 1, e107.

MASSA, V., FERNANDEZ-VIZARRA, E., ALSHAHWAN, S., BAKHSH, E., GOFFRINI, P., FERRERO, I., MEREGHETTI, P., D'ADAMO, P., GASPARINI, P. & ZEVIANI, M. 2008. Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Am J Hum Genet*, 82, 1281-9.

MATSUSHIMA, Y., ADAN, C., GARESSE, R. & KAGUNI, L. S. 2005. *Drosophila* mitochondrial transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells. *J Biol Chem*, 280, 16815-20.

MATSUSHIMA, Y., GARESSE, R. & KAGUNI, L. S. 2004. *Drosophila* mitochondrial transcription factor B2 regulates mitochondrial DNA copy number and transcription in schneider cells. *J Biol Chem*, 279, 26900-5.

METODIEV, M. D., LESKO, N., PARK, C. B., CAMARA, Y., SHI, Y., WIBOM, R., HULTENBY, K., GUSTAFSSON, C. M. & LARSSON, N. G. 2009. Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab*, 9, 386-97.

MICK, D. U., FOX, T. D. & REHLING, P. 2011. Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 14-20.

MICK, D. U., VUKOTIC, M., PIECHURA, H., MEYER, H. E., WARSCHEID, B., DECKERS, M. & REHLING, P. 2010. Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. *J Cell Biol*, 191, 141-54.

MICK, D. U., WAGNER, K., VAN DER LAAN, M., FRAZIER, A. E., PERSCHIL, I., PAWLAS, M., MEYER, H. E., WARSCHEID, B. & REHLING, P. 2007. Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J*, 26, 4347-58.

MONTOYA, J., CHRISTIANSON, T., LEVENS, D., RABINOWITZ, M. & ATTARDI, G. 1982. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 7195-9.

MONTOYA, J., GAINES, G. L. & ATTARDI, G. 1983. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell*, 34, 151-9.

MONTOYA, J., OJALA, D. & ATTARDI, G. 1981. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*, 290, 465-70.

MOOTHA, V. K., LEPAGE, P., MILLER, K., BUNKENBORG, J., REICH, M., HJERRILD, M., DELMONTE, T., VILLENEUVE, A., SLADEK, R., XU, F., MITCHELL, G. A., MORIN, C., MANN, M., HUDSON, T. J., ROBINSON, B., RIOUX, J. D. & LANDER, E. S. 2003. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 605-10.

MOSSMANN, D., MEISINGER, C. & VOGTLE, F. N. 2011. Processing of mitochondrial presequences. *Biochim Biophys Acta*.

NAGAO, A., SUZUKI, T., KATOH, T. & SAKAGUCHI, Y. 2009. Biogenesis of glutamyl-mt tRNAGln in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 16209-14.

NASS, M. M. & NASS, S. 1963. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol*, 19, 593-611.

NICHOLLS, D. G. 2001. A history of UCP1. *Biochem Soc Trans*, 29, 751-5.

NIJTMANS, L. G., ARTAL SANZ, M., BUCKO, M., FARHOUD, M. H., FEENSTRA, M., HAKKAART, G. A., ZEVIANI, M. & GRIVELL, L. A. 2001. Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *FEBS Lett*, 498, 46-51.

NIJTMANS, L. G., TAANMAN, J. W., MUIJSERS, A. O., SPEIJER, D. & VAN DEN BOGERT, C. 1998. Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem*, 254, 389-94.

OJALA, D., MONTOYA, J. & ATTARDI, G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290, 470-4.

OLIVEIRA, M. T. & KAGUNI, L. S. 2011. Reduced stimulation of recombinant Pol {gamma} and mtDNA helicase by variants of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (mtSSB) correlates with defects in mtDNA Replication in animal cells. *J Biol Chem*.

OQUENDO, C. E., ANTONICKA, H., SHOUBRIDGE, E. A., REARDON, W. & BROWN, G. K. 2004. Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet*, 41, 540-4.

OSWALD, C., KRAUSE-BUCHHOLZ, U. & RODEL, G. 2009. Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase. *J Mol Biol*, 389, 470-9.

OTT, M., PRESTELE, M., BAUERSCHMITT, H., FUNES, S., BONNEFOY, N. & HERRMANN, J. M. 2006. Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J*, 25, 1603-10.

OWUSU-ANSAH, E., YAVARI, A., MANDAL, S. & BANERJEE, U. 2008. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat Genet*, 40, 356-61.

PAGLIARINI, D. J., CALVO, S. E., CHANG, B., SHETH, S. A., VAFAI, S. B., ONG, S. E., WALFORD, G. A., SUGIANA, C., BONEH, A., CHEN, W. K., HILL, D. E., VIDAL, M., EVANS, J. G., THORBURN, D. R., CARR, S. A. & MOOTHA, V. K. 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134, 112-23.

PAPADOPOULOU, L. C., SUE, C. M., DAVIDSON, M. M., TANJI, K., NISHINO, I., SADLOCK, J. E., KRISHNA, S., WALKER, W., SELBY, J., GLERUM, D. M., COSTER, R. V., LYON, G., SCALAIS, E., LEBEL, R., KAPLAN, P., SHANSKE, S., DE VIVO, D. C., BONILLA, E., HIRANO, M., DIMAURO, S. & SCHON, E. A. 1999. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet*, 23, 333-7.

PENA, P. & GARESSE, R. 1993. The beta subunit of the *Drosophila melanogaster* ATP synthase: cDNA cloning, amino acid analysis and identification of the protein in adult flies. *Biochem Biophys Res Commun*, 195, 785-91.

PERALTA, S., CLEMENTE, P., SANCHEZ-MARTINEZ, A., CALLEJA, M., HERNANDEZ-SIERRA, R., MATSUSHIMA, Y., ADAN, C., UGALDE, C., FERNANDEZ-MORENO, M. A., KAGUNI, L. S. & GARESSE, R. 2012. CCDC56 is a novel mitochondrial protein essential for cytochrome c oxidase function.

PEREZ-MARTINEZ, X., BROADLEY, S. A. & FOX, T. D. 2003. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J*, 22, 5951-61.

PEREZ-MARTINEZ, X., BUTLER, C. A., SHINGU-VAZQUEZ, M. & FOX, T. D. 2009. Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Biol Cell*, 20, 4371-80.

- PIERREL, F., BESTWICK, M. L., COBINE, P. A., KHALIMONCHUK, O., CRICCO, J. A. & WINGE, D. R. 2007. Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J*, 26, 4335-46.
- PIERRON, D., WILDMAN, D. E., HUTTEMANN, M., MARKONDAPATNAIKUNI, G. C., ARAS, S. & GROSSMAN, L. I. 2011. Cytochrome c oxidase: Evolution of control via nuclear subunit addition. *Biochim Biophys Acta*.
- RACKHAM, O., DAVIES, S. M., SHEARWOOD, A. M., HAMILTON, K. L., WHELAN, J. & FILIPOVSKA, A. 2009. Pentatricopeptide repeat domain protein 1 lowers the levels of mitochondrial leucine tRNAs in cells. *Nucleic Acids Res*, 37, 5859-67.
- RAHMAN, S., BROWN, R. M., CHONG, W. K., WILSON, C. J. & BROWN, G. K. 2001. A SURF1 gene mutation presenting as isolated leukodystrophy. *Ann Neurol*, 49, 797-800.
- ROBERTI, M., POLOSA, P. L., BRUNI, F., MANZARI, C., DECEGLIE, S., GADALETA, M. N. & CANTATORE, P. 2009. The MTERF family proteins: mitochondrial transcription regulators and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 303-11.
- RUIZ DE MENA, I., LEFAI, E., GARESSE, R. & KAGUNI, L. S. 2000. Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in drosophila. *J Biol Chem*, 275, 13628-36.
- RUZZENENTE, B., METODIEV, M. D., WREDENBERG, A., BRATIC, A., PARK, C. B., CAMARA, Y., MILENKOVIC, D., ZICKERMANN, V., WIBOM, R., HULTENBY, K., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., BRANDT, U., STEWART, J. B., GUSTAFSSON, C. M. & LARSSON, N. G. 2011. LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J*.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (eds.) 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- SANCHEZ-MARTINEZ, A., LUO, N., CLEMENTE, P., ADAN, C., HERNANDEZ-SIERRA, R., OCHOA, P., FERNANDEZ-MORENO, M. A., KAGUNI, L. S. & GARESSE, R. 2006. Modeling human mitochondrial diseases in flies. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 1190-8.
- SASARMAN, F., BRUNEL-GUITTON, C., ANTONICKA, H., WAI, T. & SHOUBRIDGE, E. A. 2010. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell*, 21, 1315-23.
- SCHAEFER, A. M., MCFARLAND, R., BLAKELY, E. L., HE, L., WHITTAKER, R. G., TAYLOR, R. W., CHINNERY, P. F. & TURNBULL, D. M. 2008. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol*, 63, 35-9.

SCHAFER, E., SEELERT, H., REIFSCHNEIDER, N. H., KRAUSE, F., DENCHER, N. A. & VONCK, J. 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*, 281, 15370-5.

SCHAGGER, H. & PFEIFFER, K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 19, 1777-83.

SCHEFFLER, I. E. 2001. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*, 1, 3-31.

SCHMIDT, O., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 655-67.

SHUTT, T. E. & GRAY, M. W. 2006a. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet*, 22, 90-5.

SHUTT, T. E. & GRAY, M. W. 2006b. Homologs of mitochondrial transcription factor B, sparsely distributed within the eukaryotic radiation, are likely derived from the dimethyladenosine methyltransferase of the mitochondrial endosymbiont. *Mol Biol Evol*, 23, 1169-79.

SHUTT, T. E., LODEIRO, M. F., COTNEY, J., CAMERON, C. E. & SHADEL, G. S. 2010. Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12133-8.

SMEITINK, J. A., ZEVIANI, M., TURNBULL, D. M. & JACOBS, H. T. 2006. Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab*, 3, 9-13.

SMITH, D., GRAY, J., MITCHELL, L., ANTHOLINE, W. E. & HOSLER, J. P. 2005. Assembly of cytochrome-c oxidase in the absence of assembly protein Surf1p leads to loss of the active site heme. *J Biol Chem*, 280, 17652-6.

SMITS, P., SMEITINK, J. & VAN DEN HEUVEL, L. 2010. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 737385.

SOLEIMANPOUR-LICHA EI, H. R., KUH L, I., GAISNE, M., PASSOS, J. F., WYDRO, M., RORBACH, J., TEMPERLEY, R., BONNEFOY, N., TATE, W., LIGHTOWLERS, R. & CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. 2007. mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG. *Mol Cell*, 27, 745-57.

SOTO, I. C., FONTANESI, F., LIU, J. & BARRIENTOS, A. 2011. Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta*.

SPELBRINK, J. N. 2010. Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *IUBMB Life*, 62, 19-32.

SPELBRINK, J. N., LI, F. Y., TIRANTI, V., NIKALI, K., YUAN, Q. P., TARIQ, M., WANROOIJ, S., GARRIDO, N., COMI, G., MORANDI, L., SANTORO, L., TOSCANO, A., FABRIZI, G. M., SOMER, H., CROXEN, R., BEESON, D., POULTON, J., SUOMALAINEN, A., JACOBS, H. T., ZEVIANI, M. & LARSSON, C. 2001. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet*, 28, 223-31.

SPIERINGS, D., MCSTAY, G., SALEH, M., BENDER, C., CHIPUK, J., MAURER, U. & GREEN, D. R. 2005. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science*, 310, 66-7.

STARKOV, A. A. 2008. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 37-52.

STIBUREK, L., VESELA, K., HANSIKOVA, H., HULKOVA, H. & ZEMAN, J. 2009. Loss of function of Sco1 and its interaction with cytochrome c oxidase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296, C1218-26.

STIBUREK, L., VESELA, K., HANSIKOVA, H., PECINA, P., TESAROVA, M., CERNA, L., HOUSTEK, J. & ZEMAN, J. 2005. Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem J*, 392, 625-32.

SZYRACH, G., OTT, M., BONNEFOY, N., NEUPERT, W. & HERRMANN, J. M. 2003. Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J*, 22, 6448-57.

TAIT, S. W. & GREEN, D. R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 621-32.

TIRANTI, V., CORONA, P., GRECO, M., TAANMAN, J. W., CARRARA, F., LAMANTEA, E., NIJTMANS, L., UZIEL, G. & ZEVIANI, M. 2000. A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet*, 9, 2733-42.

TIRANTI, V., CHARIOT, P., CARELLA, F., TOSCANO, A., SOLIVERI, P., GIRLANDA, P., CARRARA, F., FRATTA, G. M., REID, F. M., MARIOTTI, C. & ZEVIANI, M. 1995. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene. *Hum Mol Genet*, 4, 1421-7.

TIRANTI, V., GALIMBERTI, C., NIJTMANS, L., BOVOLenta, S., PERINI, M. P. & ZEVIANI, M. 1999a. Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions. *Hum Mol Genet*, 8, 2533-40.

TIRANTI, V., HOERTNAGEL, K., CARROZZO, R., GALIMBERTI, C., MUNARO, M., GRANATIERO, M., ZELANTE, L., GASPARINI, P., MARZELLA, R., ROCCHI, M., BAYONA-BAFALUY, M. P., ENRIQUEZ, J. A., UZIEL, G., BERTINI, E., DIONISI-VICI, C., FRANCO, B., MEITTINGER, T. & ZEVIANI, M. 1998. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet*, 63, 1609-21.

TIRANTI, V., JAKSCH, M., HOFMANN, S., GALIMBERTI, C., HOERTNAGEL, K., LULLI, L., FREISINGER, P., BINDOFF, L., GERBITZ, K. D., COMI, G. P., UZIEL, G., ZEVIANI, M. & MEITTINGER, T. 1999b. Loss-of-function mutations of SURF-1 are specifically associated with Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol*, 46, 161-6.

TOIVONEN, J. M., O'DELL, K. M., PETTIT, N., IRVINE, S. C., KNIGHT, G. K., LEHTONEN, M., LONGMUIR, M., LUOTO, K., TOURAILLE, S., WANG, Z., ALZIARI, S., SHAH, Z. H. & JACOBS, H. T. 2001. Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness. *Genetics*, 159, 241-54.

TOWPIK, J. 2005. Regulation of mitochondrial translation in yeast. *Cell Mol Biol Lett*, 10, 571-94.

TSUKIHARA, T., AOYAMA, H., YAMASHITA, E., TOMIZAKI, T., YAMAGUCHI, H., SHINZAWA-ITOH, K., NAKASHIMA, R., YAONO, R. & YOSHIKAWA, S. 1995. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 269, 1069-74.

TSUKIHARA, T., AOYAMA, H., YAMASHITA, E., TOMIZAKI, T., YAMAGUCHI, H., SHINZAWA-ITOH, K., NAKASHIMA, R., YAONO, R. & YOSHIKAWA, S. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272, 1136-44.

UGALDE, C., COENEN, M. J., FARHOUD, M. H., GILINSKY, S., KOOPMAN, W. J., VAN DEN HEUVEL, L. P., SMEITINK, J. A. & NIJTMANS, L. G. 2002. New perspectives on the assembly process of mitochondrial respiratory chain complex cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 2, 117-28.

VALNOT, I., OSMOND, S., GIGAREL, N., MEHAYE, B., AMIEL, J., CORMIER-DAIRE, V., MUNNICH, A., BONNEFONT, J. P., RUSTIN, P. & ROTIG, A. 2000a. Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am J Hum Genet*, 67, 1104-9.

VALNOT, I., VON KLEIST-RETZOW, J. C., BARRIENTOS, A., GORBATYUK, M., TAANMAN, J. W., MEHAYE, B., RUSTIN, P., TZAGOLOFF, A., MUNNICH, A. & ROTIG, A. 2000b. A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet*, 9, 1245-9.

VON KLEIST-RETZOW, J. C., YAO, J., TAANMAN, J. W., CHANTREL, K., CHRETIEN, D., CORMIER-DAIRE, V., ROTIG, A., MUNNICH, A., RUSTIN, P. & SHOUBRIDGE, E. A. 2001. Mutations in SURF1 are not specifically associated with Leigh syndrome. *J Med Genet*, 38, 109-13.

WAI, T., TEOLI, D. & SHOUBRIDGE, E. A. 2008. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet*, 40, 1484-8.

WALLACE, D. C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 39, 359-407.

WALLACE, D. C. 2010. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, 51, 440-50.

WALLACE, D. C. & FAN, W. 2010. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*, 10, 12-31.

WEAARPACHAI, W., ANTONICKA, H., SASARMAN, F., SEEGER, J., SCHRANK, B., KOLESAR, J. E., LOCHMULLER, H., CHEVRETTE, M., KAUFMAN, B. A., HORVATH, R. & SHOUBRIDGE, E. A. 2009. Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet*, 41, 833-7.

WEAARPACHAI, W., SASARMAN, F., NISHIMURA, T., ANTONICKA, H., AURE, K., ROTIG, A., LOMBES, A. & SHOUBRIDGE, E. A. 2012. Mutations in C12orf62, a Factor that Couples COX I Synthesis with Cytochrome c Oxidase Assembly, Cause Fatal Neonatal Lactic Acidosis. *Am J Hum Genet*, 90, 142-51.

WILLIAMS, S. L., VALNOT, I., RUSTIN, P. & TAANMAN, J. W. 2004. Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem*, 279, 7462-9.

XIN, H., WORLAX, V., BURKHART, W. & SPREMULLI, L. L. 1995. Cloning and expression of mitochondrial translational elongation factor Ts from bovine and human liver. *J Biol Chem*, 270, 17243-9.

XU, F., ACKERLEY, C., MAJ, M. C., ADDIS, J. B., LEVANDOVSKIY, V., LEE, J., MACKAY, N., CAMERON, J. M. & ROBINSON, B. H. 2008. Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome b expression and a marked reduction in ubiquinol-cytochrome c reductase activity in mouse heart mitochondria. *Biochem J*, 416, 15-26.

ZHANG, Y. & SPREMULLI, L. L. 1998. Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. *Biochim Biophys Acta*, 1443, 245-50.

ZHU, Z., YAO, J., JOHNS, T., FU, K., DE BIE, I., MACMILLAN, C., CUTHBERT, A. P., NEWBOLD, R. F., WANG, J., CHEVRETTE, M., BROWN, G. K., BROWN, R. M. & SHOUBRIDGE, E. A. 1998. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet*, 20, 337-43.

ZORDAN, M. A., CISOTTO, P., BENNA, C., AGOSTINO, A., RIZZO, G., PICCIN, A., PEGORARO, M., SANDRELLI, F., PERINI, G., TOGNON, G., DE CARO, R., PERON, S., KRONNIE, T. T., MEGIGHIAN, A., REGGIANI, C., ZEVIANI, M. & COSTA, R. 2006. Post-transcriptional silencing and functional characterization of the *Drosophila melanogaster* homolog of human Surf1. *Genetics*, 172, 229-41.

ANEXOS

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se han publicado los siguientes artículos y revisiones:

SANCHEZ-MARTINEZ, A., LUO, N., **CLEMENTE, P.**, ADAN, C., HERNANDEZ-SIERRA, R., OCHOA, P., FERNANDEZ-MORENO, M. A., KAGUNI, L. S. & GARESSE, R. 2006. Modeling human mitochondrial diseases in flies. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 1190-8.

FONTANESI, F., **CLEMENTE, P.** & BARRIENTOS, A. 2011. Cox25 teams up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to regulate mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 expression and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 286, 555-66.

PERALTA, S., **CLEMENTE, P.**, SANCHEZ-MARTINEZ, A., CALLEJA, M., HERNANDEZ-SIERRA, R., MATSUSHIMA, Y., ADAN, C., UGALDE, C., FERNANDEZ-MORENO, M. A., KAGUNI, L. S. & GARESSE, R. 2012. CCDC56 is a novel mitochondrial protein essential for cytochrome c oxidase function. En revisión en *J Biol Chem*.



Review

Modeling human mitochondrial diseases in flies

Álvaro Sánchez-Martínez^a, Ningguang Luo^b, Paula Clemente^a, Cristina Adán^a,
Rosana Hernández-Sierra^a, Pilar Ochoa^a, Miguel Ángel Fernández-Moreno^a,
Laurie S. Kaguni^b, Rafael Garesse^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, E-28029 Madrid, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1319, USA

Received 1 March 2006; received in revised form 24 April 2006; accepted 5 May 2006

Available online 13 May 2006

Abstract

Human mitochondrial diseases are associated with a wide range of clinical symptoms, and those that result from mutations in mitochondrial DNA affect at least 1 in 8500 individuals. The development of animal models that reproduce the variety of symptoms associated with this group of complex human disorders is a major focus of current research. *Drosophila* represents an attractive model, in large part because of its short life cycle, the availability of a number of powerful techniques to alter gene structure and regulation, and the presence of orthologs of many human disease genes. We describe here *Drosophila* models of mitochondrial DNA depletion, deafness, encephalopathy, Friedreich's ataxia, and diseases due to mitochondrial DNA mutations. We also describe several genetic approaches for gene manipulation in flies, including the recently developed method of targeted mutagenesis by recombinational knock-in.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Drosophila*; Mitochondria; Mitochondrial diseases; Gene targeting; Oxidative phosphorylation

1. Introduction

The fruit fly *Drosophila* has played a critical role in the origin and development of modern biology, particularly in the field of genetics. In 1910, T. H. Morgan's experiments demonstrating the chromosome theory of heredity initiated *Drosophila* as a tool to investigate the basis of genetics and development [1]. Features that made *Drosophila* useful as an animal model in the first half of the past century are still attractive today [1,2]. These include (i) a short life cycle, (ii) the facility to feed and maintain stocks and populations without specialized instrumentation or infrastructure, (iii) the availability of non-recombinogenic balancer chromosomes, (iv) physical mapping of genes on

polytene chromosomes, (v) the straightforward use of X-rays and other mutagenic agents to generate large collections of mutant stocks and, (vi) the physical accessibility of the mechanosensory apparatus for experimentation. During the remainder of the century, new technologies were developed to manipulate and understand the *Drosophila* genome, leading to remarkable discoveries such as the genetic control of embryonic development by E. Lewis, C. Nüsslein-Volhard and E. Wieschaus [3]. Advances in molecular biology have allowed the generation of transgenic flies using P-element transposons [4], the development of the yeast UAS-GAL4-based gene overexpression system [5] and more recently, technologies based on site specific recombination to knock-in and knock-out specific genes, and RNA interference (RNAi) to knock-down gene expression (for a review, see [6]). At the same time, *Drosophila melanogaster* was one of the first organisms to be sequenced in its entirety. The first annotated sequence was published in March 2000, and it has been updated regularly (<http://flybase.net/annot/dmel-release4-notes.html>). The *Drosophila* genome contains a large number of human orthologs, demonstrating its potential as a model of human disease [7].

Abbreviations: mtDNA, mitochondrial DNA; OXPHOS, oxidative phosphorylation; NRG, Nuclear respiratory gene; COX, cytochrome oxidase; MDS, mtDNA depletion syndrome; pol γ - α , DNA polymerase γ catalytic subunit; LS, Leigh syndrome; CNS, central nervous system; FA, Friedreich's ataxia; adPEO, autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia; RNAi, RNA interference; PNS, peripheral nervous system; DSB, double-strand break

* Corresponding author. Tel.: +34 91 4975452; fax: +34 91 5854401.

E-mail address: rafael.garesse@uam.es (R. Garesse).

2. Mitochondrial biogenesis in *Drosophila*

Mitochondrial biogenesis is an essential process in cell proliferation and differentiation. It depends on the co-ordinated expression of two genomes located in different subcellular compartments, the nucleus and the mitochondrion [8]. Mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular double-stranded DNA molecule with an extremely compact organization, and a gene content that is well conserved in the animal kingdom. It encodes 22 tRNAs, 2 rRNAs and 13 polypeptides, all of which are components of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS). The rest of the subunits of the OXPHOS system (about 90) and all of the proteins involved in the maintenance and expression of mtDNA, and all other mitochondrial functions, are encoded in nuclear DNA [8].

In the last few years, several mammalian transcriptional regulators have been characterized that control the expression of both nuclear and mitochondrial genes, and therefore play a critical role in intergenomic communication [9]. Extracellular signals induce expression of PGC-1 family coactivators, which in cooperation with specific transcription factors (mainly Nuclear Respiratory Factors, NRF-1 and NRF-2), have been found to regulate the expression of many genes involved in mitochondrial biogenesis. These include structural subunits of the OXPHOS system, enzymes involved in intermediary metabolism, and several factors involved in mtDNA maintenance and transcription (reviewed in [10]). A similar framework to explain the integrated control of *Drosophila* mitochondrial gene expression has not been identified. The ortholog of *nrf-1* in *Drosophila*, *erect wing*, is essential for neurogenesis and myogenesis [11], but it has not been linked directly to regulation of mitochondrial gene expression. Thus, it is presently unknown if the circuitry that coordinates mitochondrial biogenesis at the transcriptional level in mammals is conserved in *Drosophila*.

Our laboratories and others have carried out a systematic characterization of the promoter regions of *Drosophila* genes encoding factors involved in mtDNA replication, maintenance and transcription [reviewed in [12]]. To date, these include the genes encoding the two subunits of DNA polymerase γ (α and β) [13], mtSSB [14], mtDNA helicase (L.S. Kaguni, unpublished data), mtRNA polymerase (R. Garesse, unpublished data), TFAM [15], mtTFB1 [16], mtTFB2 [17] and DmTTF [18] (Table 1). We have found that the expression of most of these genes is regulated by DREF, a transcription factor that also regulates the expression of genes involved in nuclear DNA replication and cell cycle control, including the catalytic subunit of DNA polymerase α , proliferating cell nuclear antigen, cyclin A and E2F [12]. In addition, a recently identified conserved sequence element (RTTAYRTAAY), designated as the Nuclear Respiratory Gene element (NRG), is located downstream of the transcriptional initiation site of a high proportion of nuclear genes encoding mitochondrial proteins [19]. Although there are no functional studies and the transcription factors that recognize the NRG site have yet to be identified, this element represents a good candidate for involvement in the coordinate response of genes involved in energy production in *Drosophila*, perhaps in combination with DREF. In support of this hypothesis, several of the genes encoding factors of the *Drosophila* mtDNA replication

Table 1

DNA sequence elements involved in the regulated expression of essential factors for mtDNA metabolism in *Drosophila*

Gene	DNA sequence elements		
	DRE	NRG	EWG
pol γ - α	–	–	+
pol γ - β	+	+	–
mtSSB	+	+	–
mtDNA helicase	+	–	–
mtRNA pol	–	+	–
TFAM	+	+	–
mtTFB1	+	–	–
mtTFB2	+	–	–
mtTTF	+	–	–

The proximal promoter (2 Kb) and 3'-upstream gene regions of several genes encoding essential factors for *Drosophila* mtDNA metabolism have been analyzed *in silico*, to search for potential binding sites for DREF, NRG and EWG. The functional role of all DREF binding sites except that in the gene for mtTFB1 has been demonstrated by EMSA and cell transfection analyses. [14 (mtSSB), 65 (pol γ - β), 66 (Tfam) and unpublished data from our laboratories].

and transcription machineries contain both DRE and NRG sites.

To begin to understand the regulation of mitochondrial biogenesis during embryonic development, we have studied by *in situ* hybridization and immunostaining the spatio-temporal expression pattern of genes encoding mtDNA replication factors as markers of mitochondrial proliferation, and those encoding structural components of the OXPHOS system as markers of mitochondrial differentiation. We have found that genes involved in mtDNA metabolism are highly expressed in the gut, and in some cases in additional cellular domains of the embryo. OXPHOS genes are also highly expressed in the gut, but are also expressed at high levels in other tissues including the mesoderm (M.A. Fernández-Moreno and R. Garesse, unpublished data). These results indicate that mitochondrial proliferation and differentiation are not strictly coupled during development.

Interestingly, the molecular characterization of *bonsai* mutants has also revealed that the gut is extremely active in mitochondrial biogenesis during *Drosophila* development [20]. The Bonsai protein is highly expressed in the gut, localizes to mitochondria and shows strong homology to prokaryotic ribosomal protein S15, suggesting a role in mitochondrial translation. However, the precise role of Bonsai in mitochondrial function remains to be determined.

3. *Drosophila* as an animal model to study human mitochondrial diseases

Drosophila provides a useful model for studying several complex biological processes because it is ideally tractable at the genetic, biochemical, molecular and physiological levels. It has served as a model in studies of development and differentiation [3], aging [21], cell cycle [22], transcriptional and translational control [23], signaling pathways [24], response to hypoxia [25], sensorial perception [26], and circadian rhythms [27]. In addition, the presence in *Drosophila* of orthologs of genes involved in human diseases has spawned interest in using it to

understand the molecular basis of disease, and to discover new therapies. Representative research using *Drosophila* has been focused on neurodegenerative diseases [7,28], cancer [29], cardiac pathologies [30], age-associated dysfunction [31], sensitivity to pollutants [32], and more recently on mitochondrial diseases (see below).

Mitochondrial diseases, mainly due to the alteration of OXPHOS functions, are associated with a wide range of clinical symptoms, especially those in neurodegenerative disorders, such as blindness, deafness, dementia, movement disorders, ataxia, coreia, and encephalopathies [33,34]. Mitochondrial defects are also associated with muscular weakness, cardiac failure, diabetes, renal dysfunction and hepatic disease. The clinical and genetic diversity of mitochondrial pathologies makes it difficult to estimate their incidence in the population, which in composite, is considered relatively high. The alteration of OXPHOS function caused by known mutations in mtDNA affects at least 1 in 8500 people. One of the main objectives in understanding the physiopathology of mitochondrial diseases is to create amenable animal models that reproduce the variety of symptoms associated with this group of complex human disorders. Although a great effort is currently focused on developing mammalian models of human mitochondrial pathologies, *Drosophila* emerges as an attractive, tractable alternative.

3.1. mtDNA depletion

mtDNA depletion syndrome (MDS) is caused by a defect in intergenomic communication that results in decreased mtDNA content (i.e., a low mtDNA/ nDNA ratio). Children usually present with hypotonia, lactic acidosis and elevated serum creatine kinase. Some also have severe hepatopathy or renal involvement mimicking de Toni–Fanconi syndrome. The symptoms can also involve multiple systems affecting the muscle. Mutations in the genes encoding the mitochondrial deoxyguanosine and deoxythymidine kinases are associated with the hepatocerebral and the myopathic forms of MDS [35]. In addition, preliminary studies have also shown a deficient activity of DNA polymerase γ in tissues of patients suffering MDS [36].

Our laboratories have used the UAS-GAL4 system to alter the level of mtDNA in the fly. Overexpression of a wild-type version of the catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase (pol γ - α) interferes with the process of mtDNA replication and produces a significant decrease in the amount of mtDNA [37]. We have analyzed the consequences of the mtDNA depletion in the whole animal, and specifically in two tissues affected in MDS patients, muscle and nervous system. mtDNA depletion resulting from constitutive overexpression is lethal at the pupal stage, a phenotype that is also observed upon specific overexpression in the muscle. Interestingly, the induction of mtDNA depletion in the nervous system is not lethal. The main phenotype detected in adults is an increase in the population mortality rate, and a moderate but significant increase in apoptosis in the larval brain, which likely contributes to the phenotype. This model presents the opportunity to characterize the molecular and metabolic responses of various tissues to mtDNA depletion, and to develop methods that alle-

viate it. At the same time, recognizing that overexpression of the wild-type catalytic subunit may generate secondary effects not related directly to the mtDNA depletion, we are complementing these studies with the introduction of specific mtDNA mutations in the pol γ - α gene by homologous recombination (see below).

3.2. Mitochondrial deafness

The *Drosophila* mutant *technical knock-out*, *tko*, carries a point mutation affecting a phylogenetically conserved residue in the nuclear gene encoding the mitochondrial ribosomal protein S12 (MRPS12). This behavioural mutant exhibits developmental retardation at the larval stage, bang sensitivity, defective response to sound, quantitatively reduced mitochondrial translational capacity and impaired male courtship [38]. The primary biochemical defect is a decrease in OXPHOS and ATP synthase activities in mitochondria. *tko* mutants possess various features of mitochondrial disorders in humans, and these phenotypes are reverted by transgenic expression of a wild-type copy of the *tko* gene. The transgenic reversion analysis revealed critical steps and cell types that were responsible for the disease-like phenotype [39]. Furthermore, inbreeding of mutant lines resulted in a systematic improvement of the phenotypic outcome. These features have made the *tko* mutant a suitable model for many forms of human mitochondrial disease that are characterized by a reduction in the mitochondrial respiratory capacity and a generalized OXPHOS deficiency and in particular, for sensorineural deafness.

3.3. Mitochondrial encephalopathy

Mutations in mtDNA and in nuclear-encoded mitochondrial proteins cause a group of devastating encephalomyopathies with complex clinical features [40]. Leigh syndrome (LS) is the most common infantile mitochondrial encephalopathy and is characterized by symmetric necrotic lesions in the brainstem, diencephalon and basal ganglia. Symptoms usually include nystagmus, ataxia, dystonia, hypotonia and optic atrophy. Although the cause of the disease is genetically heterogeneous, mutations in the *surf-1* gene are the single most prevalent cause of LS [41]. The *surf-1* gene is highly conserved from prokaryotes to humans, and is expressed ubiquitously in human tissues, albeit at higher levels in aerobic tissues. It encodes a 31 kDa protein located in the inner mitochondrial membrane. Previous studies in human cells [42], mice [43] and yeast [44] showed that Surf-1 is involved in COX complex assembly. Nonetheless, the molecular mechanism leading to the pathogenic course of LS is not fully understood.

Zordan and co-workers performed a functional knock-down of Surf-1 in *Drosophila* using an RNAi strategy [45]. Post-transcriptional gene silencing was induced by GAL4-mediated expression of an UAS inverted-repeat transgene. Ubiquitous silencing results in severely impaired development. Larvae are smaller and exhibit profound alterations in spontaneous and light-induced locomotion. Most individuals die before entering pupariation. Notably, behavioural and electrophysiological abnormalities were found not to be due to structural defects, but

were rather caused by a deficient energy supply. When *surf-1* was silenced exclusively in the central nervous system (CNS), individuals developed to adulthood and exhibited altered mitochondria in larval muscles, and decreased COX activity in cephalic sections. Because both development and metamorphosis are high energy-requiring processes, a defect in respiration and ATP synthesis may be responsible for the developmental delay and the late larval lethality observed in Surf-1-deficient larvae. The results obtained in the *Drosophila* model suggest important functions for Surf-1 in COX activity, and establish a critical role for mitochondrial energy pathways in organogenesis, development and CNS function that are likely to be similar in humans.

3.4. Friedreich ataxia

Friedreich ataxia (FA) is an inherited recessive neurodegenerative disorder associated with a genetic insufficiency of frataxin in humans [46]. Frataxin is encoded by the *FRDA* gene and has a predicted size of 210 amino acids [47]. It is a mitochondrial iron chaperone that plays a critical role in iron storage, cellular iron homeostasis and biogenesis of Fe–S clusters. As an iron binding protein, frataxin prevents Fe⁺² from generating toxic hydroxyl radicals inside the mitochondrial matrix.

Most FA patients are homozygous for a GAA triplet repeat expansion in the first intron of the *FRDA* gene. While normal chromosomes contain up to 40 repeats, FA chromosomes harbor between 90 and 1000 triplets. Due to the meiotic and mitotic instability of the expanded alleles, FA patients have insufficient frataxin levels, resulting in iron accumulation in mitochondria and dysfunctional iron-containing proteins, specifically aconitase and the OXPHOS complexes. The peripheral nervous system (PNS) and heart are among the most severely affected tissues. Hence, FA is characterized by progressive neurological disability and heart abnormalities. The age of onset may vary from infancy to adulthood, but FA usually appears during childhood. Variations in symptoms and age of onset suggest that other factors in addition to the degree of triplet expansion influence disease progression, and there is currently no effective therapy for this devastating disease.

Frataxin is highly conserved throughout evolution. Orthologs have been identified in mammals, invertebrates, yeast and plants, and several models have already been used to gain insight into the functions of frataxin and its related disease. Previous studies in yeast revealed that deletion of YFH1, the frataxin homolog, produces iron accumulation in mitochondria and a progressive loss of respiratory competence and mtDNA. As a result, Δ YFH1 strains exhibit permanent mitochondrial damage and dysfunction [48]. Cell differentiation experiments performed in mouse cell lines demonstrated that frataxin is essential for development of neural lineages [49]. Although mouse models for FA showed early embryonic lethality [50] conditional inactivation of the mouse FA gene led to cardiomyopathy, sensory nerve defects and Fe–S enzyme deficiency [51].

A RNAi strategy was used in *Drosophila* to suppress production of the frataxin homolog (DFH) in a global or tissue-specific manner [52]. The main advantage in the *Drosophila* system as compared to other eukaryotic models is that inverted

repeat transgenes used in RNAi reduce rather than totally eliminate the corresponding protein. Thus, the *Drosophila* model mimics more accurately the genetic origin of FA, which arises from a decrease rather than a complete loss of frataxin. Furthermore, the fly model also circumvents the early embryonic lethality reported in frataxin-null mice. Systemic suppression of the *dfh* gene led to large, long-lived larvae that showed diminished iron cofactor-dependent enzyme activity, and increased susceptibility to iron toxicity. Because prolonged larval development and failure to initiate and complete metamorphosis are common features of *Drosophila* mutants defective in mtDNA maintenance, observations from this model prompted the hypothesis that DFH depletion may lead to increased mtDNA damage. Whereas silencing of the *dfh* gene in motor neurons had no deleterious effect, silencing in the PNS resulted in normal larval development but a reduced adult life span. Overexpression of primary ROS-metabolizing enzymes, such as SOD1, SOD2 and catalase in combination with silencing of the *dfh* gene did not improve the phenotype, suggesting that oxidative stress is not a major contributor.

The *Drosophila* model of FA is further validated by the fact that the vulnerability of the PNS to frataxin depletion is conserved across the animal kingdom. Because a DFH deficiency produces a robust phenotype in *Drosophila*, the fly model may aid in the identification of factors that alleviate FA symptoms, and the development of novel treatment strategies.

3.5. Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations

Point mutations in mtDNA are associated with a wide range of severe mitochondrial diseases, including a number of encephalomyopathies with complex clinical features [33]. Although some of the mutations have been characterized in cybrid cell lines, and demonstrated to produce a clear mitochondrial impairment, it has not been possible to study the consequences of the mutations in animal model systems because of the currently inability to transform mitochondria with exogenous DNA. Very recently, the first pathogenic mtDNA mutation in an intact animal was reported in *Drosophila*, a G–A transition that affects an evolutionarily conserved amino acid residue in the *ATP6* gene [53]. Point mutations in the human *ATP6* gene cause neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP), maternally inherited Leigh's syndrome (MILS) and familial bilateral striatal necrosis (FBSN) [33]. Notably, the G–A transition in the *ATP6* gene was found in virtually homoplasmic levels in a *Drosophila sesB* stock that carries a mutation in the *ANT1* gene, which is associated with autosomal dominant progressive external ophtalmoplegia (adPEO) in humans [54]. Patients with PEO are predisposed to secondary mtDNA mutations, and it is thus possible that a similar mutator effect has occurred in *Drosophila*. The *ATP6* mutation inhibits significantly the activity of ATP synthase, but surprisingly does not affect the respiration rate, and therefore the mitochondria are uncoupled. Most interestingly, *Drosophila ATP6* mutants have a short life span, locomotion impairment and myodegeneration that are strictly progressive, a situation similar to human mitochondrial encephalomyopathy of mitochondrial origin. Although the

mutation per se does not induce neurodegeneration, neurological dysfunction was apparent.

4. New perspectives for gene manipulation in *Drosophila*

Until recently, *Drosophila* models used in the study of mitochondrial dysfunction were based on the analysis of mutants generated by random mutagenic screens, or by gene silencing by RNAi that is based on P-element transgenesis. One of the main advantages of the fly system is the UAS–GAL4 binary system, which can be exploited to knockdown a target gene under the control of alternative promoters, thus restricting silencing to a desired spatio-temporal pattern. More recently, new technologies for gene manipulation in *Drosophila* have been expanded to include new genome integration methods based on bacteriophage ϕ C31 or piggybacks that show much less insertional specificity than P-elements [6]. Despite these advances, the study of specific mutations associated with human diseases has been hampered by the lack of gene targeting techniques, one of the main limitations in working with *Drosophila*. Golic and co-

workers have recently circumvented this drawback with the development of efficient homologous recombination-based methods [55]. Any endogenous locus can be replaced or deleted by the expression of a site-specific recombinase and a site-specific nuclease, taking advantage of the fact that double-strand breaks (DSB) in *Drosophila* DNA are recombinogenic. There are currently two techniques that use homologous recombination for gene replacement, “Ends-in” and “Ends-out”. These systems have similar efficiencies but present different advantages and disadvantages.

4.1. Ends-in

The Ends-in approach first introduces a version of the gene containing the mutation of interest in tandem with the endogenous allele, and then removes one of the copies leaving only the mutated or wild-type allele in the chromosome. The main advantage of this approach is that intact alleles can be recovered that harbor the desired mutation.

The Ends-in targeting technique is executed in three steps (Fig. 1A and B). First, a P-element construct is generated that

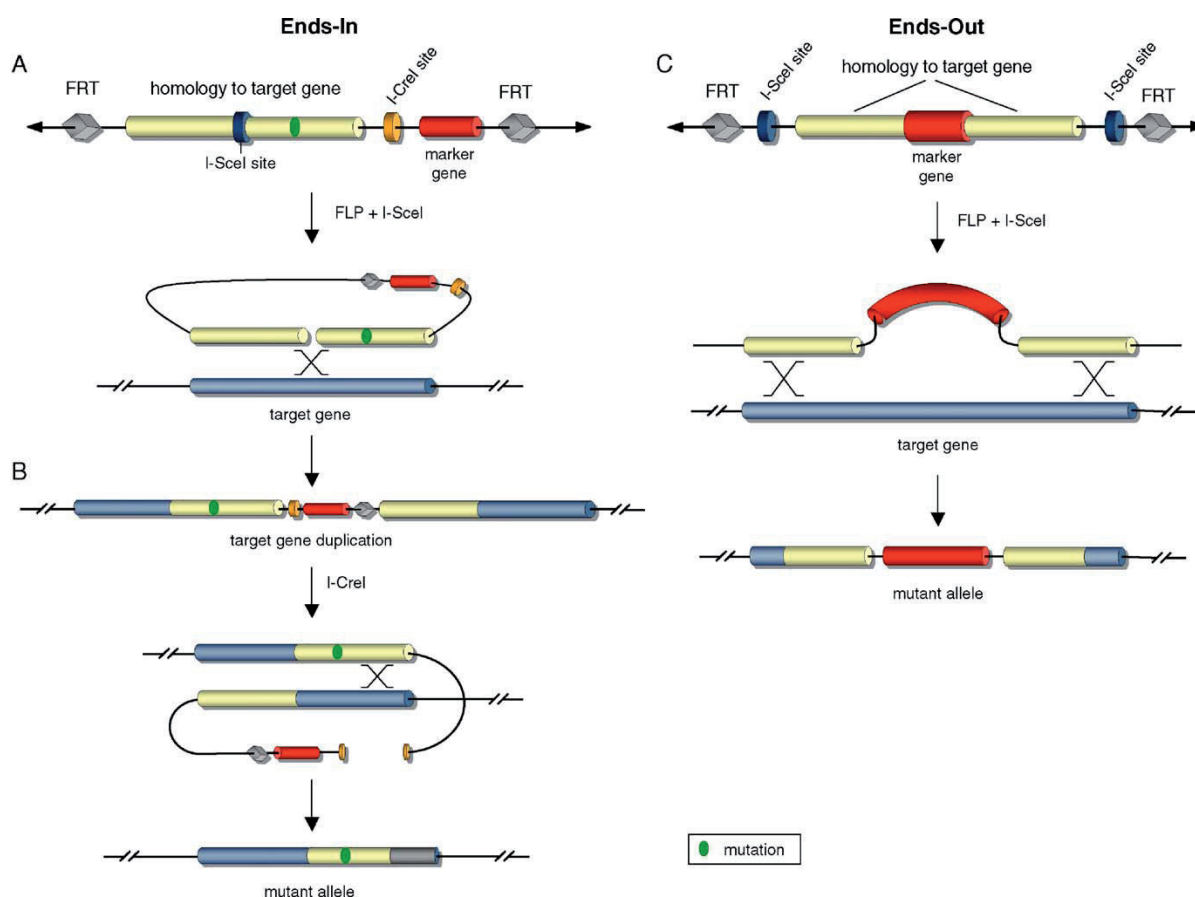


Fig. 1. Gene targeting in *Drosophila*. A, Ends-in technique and the elements of the donor construct. After transgenesis the combined action of FLP and endonuclease I-SceI generates the recombinogenic template, which produces the duplication at the target gene locus by homologous recombination. B, reduction of target gene repeats. The double-strand break caused by endonuclease I-CreI induces the second recombination. Ends-in targeting introduces a point mutation (green dot) in one of the alleles of the target gene. C, Ends-out technique. FLP and I-SceI generate a linear DNA molecule that undergoes homologous recombination with the target gene.

incorporates several specific features: a DNA region homologous to the target gene containing the specific mutation(s), two FLP Recombination Target (FRT) sequences, an I-SceI endonuclease recognition site, an I-CreI endonuclease recognition site, and a marker gene, usually *white*⁺. P-element transformation is performed by standard methods [4]. The range of total local homology that has led to successful targeting is between 2 kb and 9 kb, with >4 kb utilized in most cases [56]. Second, a series of crosses between the transgenic flies carrying the donor element with fly stocks harboring FLP and I-SceI transgenes allow the expression of the enzymes by heat shock induction, thus generating the recombinogenic donor, and inducing targeted homologous recombination. Homologous recombination generates a typical structure in which the endogenous and the mutant copies of the gene flank the marker gene at the target locus. The *wild-type-white⁺-mutant* gene structure is not expected to manifest a phenotype until reduction. Finally, a second homologous recombination event resulting from expression of the endonuclease I-CreI removes one copy of the gene, the wild-type or the mutant, and the *white* marker. This results in the replacement of the endogenous copy with a version containing the specific mutation without any other alterations in the genome. To date, this novel method has been used to generate mutant alleles of several endogenous *Drosophila* genes [57].

4.2. Ends-out

Ends-out targeting is the most frequently used method in mice and yeast. This technique starts with a different donor construct structure, and also differs from Ends-in in the position of the specific-site endonuclease cleavage sites (Fig. 1C). The double-stranded breakage occurs at the outer ends of donor DNA. The

process of Ends-out targeting is similar to Ends-in targeting; through the action of FLP and I-SceI, a linear DNA extrachromosomal donor fragment is generated, and it is targeted to the endogenous allele by homologous recombination. Two of the advantages of the Ends-out method are that the target gene can be replaced without the involvement of a tandem duplication, thus generating a knock-in or knock-out in one step. In addition, the donor construct is easier to make than in Ends-in. The disadvantage of this technique is that the end product leaves exogenous sequence at the altered locus, usually the marker gene [58]. Ends-out gene targeting has been used successfully to target *yellow*, the myocardin-related transcription factor *DMRTF*, and the odorant receptor gene, *Or83b* (reviewed in [6]).

5. Current models of mitochondrial diseases in flies

In our laboratories, we are developing a *Drosophila* model of mitochondrial pathology associated with pol γ mutations using the knock-in technology. Even though we have been successful in circumventing by low-level expression the deleterious phenotypes engendered with high-level overexpression of wild-type pol γ - α we recognize that potential problems may result from developmental and spatial mis-expression of a transgene. Thus, we have altered our strategy for mutagenesis in *Drosophila* to use targeted gene replacement by homologous recombination (Fig. 2). Our objective has been to introduce in *Drosophila* versions of the pol γ - α gene that are associated with PEO in humans, and to examine the effects of several mutations in the *Drosophila* pol γ - α and pol γ - β genes for which disease phenotypes have not yet been reported in humans. Of the 30 different mutations that have been identified in the human pol γ - α gene [59], approximately half are in strictly conserved positions in the orthologous gene in

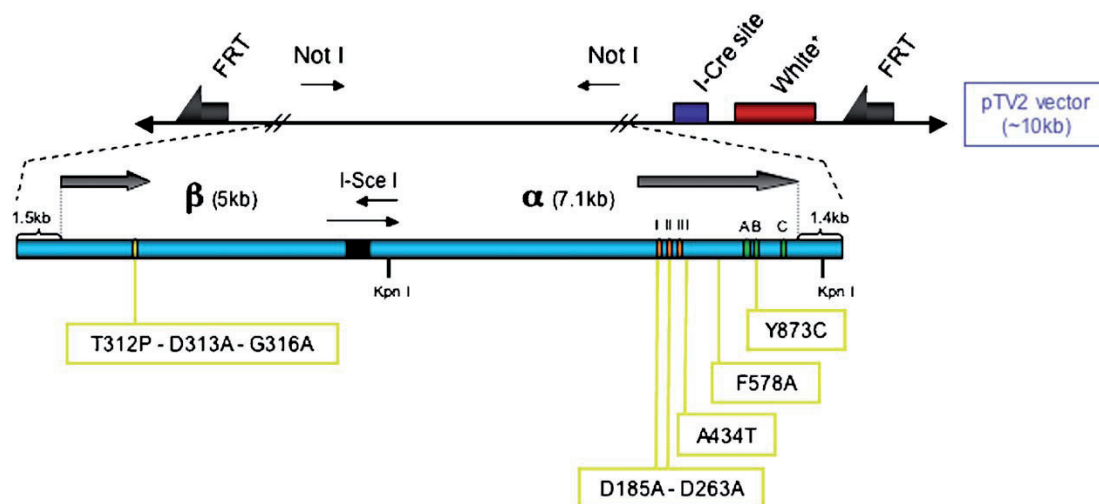


Fig. 2. Pol γ knock-in in *Drosophila*. Approximately 12 kb of DNA from the *D. melanogaster* pol γ cluster genomic region [60] was amplified by PCR and cloned into the vector pBluescript. For simplicity, only the pol γ - α and pol γ - β genes are shown schematically (arrows). The I-SceI recognition site was introduced between the genes, and this construct was used to generate specific mutations (boxed in yellow) in the pol γ - α or pol γ - β coding regions. The conserved exonuclease (I, II and III), and polymerase (A, B and C) active site motifs are indicated by boxes. Each of the modified genomic DNAs was cloned into the *NotI* site of the pTV2 vector, and the orientation of the inserted DNA was confirmed by *KpnI* digestion. The main features of the pTV2 vector are indicated as follows: FRTs (arrows), *white*⁺ marker gene (red box), I-CreI recognition site (blue box), *NotI* recognition sites (thin arrows).

Drosophila. We have selected two, A467T and Y955C (A434T and Y873C in *Drosophila*), which map within the conserved $\gamma 1$ element in the spacer region and the pol domain, respectively, and for which we and others have already evaluated the biochemical defects upon recombinant expression in the baculovirus system [60–63]. We have also selected the *Drosophila* $\gamma 3$ spacer-region mutation F578A, for which we have defined the biochemical defects [64]. In addition, we have introduced a double mutation (D185A and D263A) within two active site aspartate residues in the exonuclease domain, which we have shown to cause developmental defects, delays and arrest, and to limit life span when it is expressed at a low level using the UAS-GAL4 system in transgenic animals. Finally, we took advantage of our prior discovery that the two subunits of *Drosophila* pol γ map within a compact gene cluster [13] to generate a fragment containing ~ 12 kb donor homology that carries both the pol γ - α and - β genes, with the I-SceI site introduced between them. This allowed us to introduce specific amino acid substitutions in both pol γ - α and - β in a single recombinant donor construct. After homologous recombination, the expected product is a tandem partial duplication of the target genome sequence, with one copy containing the desired pol γ - α mutation and the other copy containing the desired pol γ - β mutation. As a result, we have also introduced three mutations in the C-terminal region of the *Drosophila* accessory subunit gene, which we have shown to be deleterious in our biochemical analysis of human pol γ - β .

Our immediate goals will be to evaluate these models using established protocols in *Drosophila* to analyze mtDNA content and integrity, respiratory chain complex activity, mitochondrial distribution and function, apoptotic signaling and importantly, larval and adult behaviour. We expect to establish an experimental system of mtDNA replication failure that is analogous to that associated with human pathologies and in doing so, we will establish a direct correlation between the defect(s) that the mutants exhibit in our biochemical assays and their phenotypic effects *in vivo*. We anticipate that this will set the stage for us to use the power of *Drosophila* molecular genetics to search for factors that modulate the phenotype, either augmenting or ameliorating it.

6. Concluding remarks

Although tissues requiring high oxidative metabolism are affected most severely in mitochondrial disorders, specific tissue involvement varies considerably. In order to develop therapies for these diseases, it is necessary to determine both the cellular processes and the tissues that are altered by insufficient energy supply. *Drosophila* models can help us to understand common aspects of these pathologies because they enable the identification of critical times, cell types and tissues that account for the disease-like phenotypes. Global transcriptional analysis of these models has already revealed many sets of genes, including those related to stress responses and metabolism, which are systematically up- or down-regulated according to the degree of the mitochondrial dysfunction. The ultimate aim of such transcriptomic approaches is to identify potential pharmacological targets in mitochondrial disease.

Because the recent development of efficient gene targeting methods has paved the way for the introduction of specific mutations responsible for human mitochondrial diseases, *Drosophila* offers substantial promise for understanding the pathogenic mechanisms of this devastating group of diseases.

Acknowledgements

We thank Erin Wakeling for critical reading and comments on the manuscript. This work was supported by European Union Project QLGI-CT-2001-00966, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (Grants BMC01-1525 and BFU2004-04591) and Instituto de Salud Carlos III, Redes de centros RCMN (C03/08) and Temáticas (G03/011 (to R.G.) and National Institutes of Health Grant GM45295 (to L.S.K.).

References

- [1] G.M. Rubin, E.B. Lewis, A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research, *Science* 287 (2000) 2216–2218.
- [2] M.A. Fernández-Moreno, C.L. Farr, L.S. Kaguni, R. Garesse. *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Function, in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc, Totowa, NJ. (in press).
- [3] M. Bate, A. Martínez-Arias, *The Development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.
- [4] G.M. Rubin, A.C. Spradling, Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors, *Science* 218 (1982) 348–353.
- [5] A.H. Brand, N. Perrimon, Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes, *Development* 118 (1993) 401–415.
- [6] K.J. Venken, H.J. Bellen, Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 167–178. (Erratum in: *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005)340).
- [7] J. Bilen, N.M. Bonini, *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease, *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 153–171.
- [8] R. Garesse, C.G. Vallejo, Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes, *Gene* 263 (2001) 1–16.
- [9] R.C. Scarpulla, Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1576 (2002) 1–14.
- [10] R.C. Scarpulla, Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 673–683.
- [11] S.M. DeSimone, K. White, The *Drosophila* erect wing gene, which is important for both neuronal and muscle development, encodes a protein which is similar to the sea urchin P3A2 DNA binding protein, *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 3641–3649.
- [12] R. Garesse, L.S. Kaguni, A *Drosophila* model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation, *IUBMB Life* 57 (2005) 555–561.
- [13] E. Lefai, M.A. Fernandez-Moreno, L.S. Kaguni, R. Garesse, The highly compact structure of the mitochondrial DNA polymerase genomic region of *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications, *Insect Mol. Biol.* 9 (2000) 315–322.
- [14] I. Ruiz de Mena, E. Lefai, R. Garesse, L.S. Kaguni, Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in *Drosophila*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13628–13636.
- [15] K. Takata, H. Yoshida, F. Hirose, M. Yamaguchi, M. Kai, M. Oshige, I. Sakimoto, O. Koiwai, K. Sahaguchi, *Drosophila* mitochondrial transcription factor A: characterization of its cDNA and expression pattern during development, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (2001) 474–483.
- [16] Y. Matsushima, C. Adán, R. Garesse, L.S. Kaguni, *Drosophila* transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16815–16820.

- [17] Y. Matsushima, R. Garesse, L.S. Kaguni, *Drosophila* transcription factor B2 regulates mitochondrial DNA copy number and transcription in Schneider cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26900–26905.
- [18] M. Roberti, P. Fernández-Silva, P.L. Polosa, E. Fernández-Viana, F. Bruni, S. Deceglie, J. Montoya, M.N. Gadaleta, P. Cantatore, In vivo transcription termination activity of the *Drosophila* mitochondrial DNA-binding protein DmTTF, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005) 357–362.
- [19] M. Sardiello, G. Tripoli, A. Romito, C. Minervini, L. Viggiano, C. Caggese, G. Pesole, Energy biogenesis: one key for coordinating two genomes, *Trends Genet.* 21 (2005) 12–16.
- [20] M. Galloni, Bonsai, a ribosomal protein S15 homolog, involved in gut mitochondrial activity and systemic growth, *Dev. Biol.* 264 (2003) 482–494.
- [21] S.L. Helfand, B. Rogina, Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, *Annu. Rev. Genet.* 37 (2003) 329–348.
- [22] Y.H. Song, *Drosophila melanogaster*: a model for the study of DNA damage checkpoint response, *Mol. Cell* 19 (2005) 67–179.
- [23] J.E. Wilhelm, C.A. Smibert, Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*, *Biol. Cell* 97 (2005) 235–252.
- [24] S.A. Davies, Signalling via cGMP: Lessons from *Drosophila*, *Cell. Signal.* 18 (2006) 409–421.
- [25] R. Farahani, C.G. Haddad, Understanding the molecular responses to hypoxia using *Drosophila* as a genetic model, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 135 (2003) 221–229.
- [26] R.L. Davis, Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience, *Annu. Rev. Neurosci.* 28 (2005) 275–302.
- [27] P.E. Hardin, The circadian timekeeping system of *Drosophila*, *Curr. Biol.* 15 (2005) 714–722.
- [28] L. Chen, M.B. Feany, Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 657–663.
- [29] E.C. Woodhouse, L.A. Liotta, *Drosophila* invasive tumors: a model for understanding metastasis, *Cell Cycle* 3 (2004) 38–40.
- [30] M.J. Wolf, H. Amrein, J.A. Izatt, M.A. Choma, M.C. Reedy, H.A. Rockman, *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 1394–1399.
- [31] M. Saitoe, J. Horiuchi, T. Tamura, N. Ito, *Drosophila* as a novel animal model for studying the genetics of age-related memory impairment, (16) *Rev. Neuroscience* (2005) 137–149.
- [32] M. Wilson, J.H. Widdicombe, K. Gohil, K.C. Burtis, A.Z. Reznick, C.E. Cross, J.P. Elserich, Are *Drosophila* a useful model for understanding the toxicity of inhaled oxidative pollutants: a review, *Inhal. Toxicol.* 17 (2005) 765–774.
- [33] R. McFarland, R.W. Taylor, D.M. Turnbull, The neurology of mitochondrial DNA disease, *Lancet Neurol.* 1 (2002) 343–351.
- [34] J.A. Smeitink, M. Zeviani, D.M. Turnbull, H.T. Jacobs, Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders, *Cell Metab.* 3 (2006) 9–13.
- [35] A. Spinazzola, M. Zeviani, Disorders of nuclear-mitochondrial inter-genomic signalling, *Gene* 354 (2005) 16–18.
- [36] R.K. Naviaux, W.L. Nyhan, B.A. Barshop, J. Poulton, D. Markusic, N.C. Karpinski, R.H. Haas, Mitochondrial DNA polymerase γ deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome, *Ann. Neurol.* 45 (1999) 54–58.
- [37] E. Lefai, M. Calleja, I. Ruiz de Mena, A.T. Lagina III, L.S. Kaguni, R. Garesse, Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase γ results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Gen. Genet.* 264 (2000) 37–46.
- [38] J.M. Toivonen, K.M. O'Dell, N. Petit, S.C. Irvine, G.K. Knight, M. Lehtonen, M. Longmuir, K. Luoto, S. Touraille, Z. Wang, S. Alziari, Z.H. Shah, H.T. Jacobs, Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness, *Genetics* 159 (2001) 241–254.
- [39] H.T. Jacobs, J. Fernandez-Ayala, S. Manjiry, E. Kemppainen, J.M. Toivonen, K.M. O'Dell, Mitochondrial disease in flies, *Biochim. Biophys. Acta* 1659 (2004) 190–196.
- [40] S. DiMauro, E.A. Schon, Mitochondrial respiratory chain diseases, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 2656–2658.
- [41] M. Bohm, E. Pronicka, E. Karcmarewicz, M. Pronicki, D. Piekutowska-Abramczuk, J. Sykut-Cegielska, H. Mierzewska, H. Hansikova, K. Vesela, M. Tesarova, H. Houstkova, J. Houstek, J. Zeman, Restrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome *c* oxidase deficiency, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 21–26.
- [42] V. Tiranti, C. Galimberti, L. Nijtmans, S. Bovolenta, M.P. Perini, M. Zeviani, Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 2533–2540.
- [43] A. Agostino, F. Invernizzi, C. Tiveron, G. Fagioli, A. Prella, E. Lamantea, A. Giavazzi, G. Battaglia, L. Tatangelo, V. Tiranti, M. Zeviani, Constitutive knockout of Surf1 is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome *c* oxidase deficiency in mice, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 399–413.
- [44] L.G. Nijtmans, M. Artal-Sanz, M. Bucko, M.H. Farhoud, M. Feenstra, G.A. Hakkaart, M. Zeviani, L.A. Grivell, Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome *c* oxidase in yeast, *FEBS Lett.* 498 (2001) 46–51.
- [45] M.A. Zordan, P. Cisotto, C. Benna, A. Agostino, G. Rizzo, A. Piccin, M. Pegoraro, F. Sandrelli, G. Perini, G. Tognon, R. De Caro, S. Peron, T.T. Kronnie, A. Megighian, C. Reggiani, M. Zeviani, R. Costa, Post transcriptional silencing and functional characterization of the *Drosophila melanogaster* homolog of HumanSurf1, *Genetics* 172 (2006) 229–241.
- [46] V. Campuzano, L. Montermini, M.D. Molto, L. Pianese, M. Cossee, F. Cavalcanti, E. Monros, F. Rodius, F. Duclos, A. Monticelli, F. Zara, J. Canizares, H. Koutnikova, S.I. Bidichandani, C. Gellera, A. Brice, P. Trouillas, G. De Michele, A. Filla, R. De Frutos, F. Palau, P.I. Patel, S. Di Donato, J.L. Mandel, S. Coccozza, M. Koenig, M. Pandolfo, Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion, *Science* 271 (1996) 1423–1427.
- [47] M. Pandolfo, Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction, *Mitochondrion* 2 (2002) 87–93.
- [48] M. Babcock, D. de Silva, R. Oaks, S. Davis-Kaplan, S. Jiralerspong, L. Montermini, M. Pandolfo, J. Kaplan, Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin, *Science* 276 (1997) 1709–1712.
- [49] M. McBurney, W.E.M. Jones-Villeneuve, M.K. Edwards, P.J. Anderson, Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line, *Nature* 299 (1982) 165–167.
- [50] M. Cossee, H. Puccio, A. Gansmuller, H. Koutnikova, A. Dierich, M. LeMeur, K. Fischbeck, P. Dolle, M. Koenig, Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 1219–1226.
- [51] H. Puccio, D. Simon, M. Cossee, P. Criqui-Filipe, F. Tiziano, J. Melki, C. Hindelang, R. Matyas, P. Rustin, M. Koenig, Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits, *Nat. Genet.* 27 (2001) 181–186.
- [52] P.R. Anderson, K. Kirby, A.J. Hilliker, J.P. Phillips, RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 3397–3405.
- [53] A.M. Celotto, A.C. Frank, S.W. McGrath, T. Fergestad, W.A. Van Voorhies, K.F. Buttle, C.A. Mannella, M.J. Palladino, Mitochondrial encephalomyopathy in *Drosophila*, *J. Neurosci.* 26 (2006) 810–820.
- [54] J. Kaukonen, J.K. Juselius, V. Tiranti, A. Kittala, M. Zeviani, G.P. Comi, S. Keranene, L. Peltonene, A. Suomalainen, Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance, *Science* 289 (2000) 782–785.
- [55] Y.S. Rong, K.G. Golic, Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*, *Science* 288 (2000) 2013–2018.
- [56] X. Bi, Y.S. Rong, Genome manipulation by homologous recombination in *Drosophila*, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, vol. 2, 2003, pp. 142–146.
- [57] Y.S. Rong, S.W. Titen, H.B. Xie, M.M. Golic, M. Bastiani, P. Bandyopadhyay, B.M. Olivera, M. Brodsky, G.M. Rubin, K.G. Golic, Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*, *Genes Dev.* 16 (2002) 1568–1581.
- [58] W.J. Gong, K.G. Golic, Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 2556–2561.

- [59] A. Di Fonzo, A. Bordoni, M. Crimi, G. Sara, R. Del Bo, N. Bresolin, G.P. Comi, POLG mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions, *Hum. Mutat.* 22 (2003) 498–499.
- [60] P.T. Luoma, N. Luo, W.N. Loscher, C.L. Farr, R. Horvath, J. Wanschitz, S. Kiechl, L.S. Kaguni, A. Suomalainen, Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia–myopathy syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 1907–1920.
- [61] S.S. Chan, M.J. Longley, W.C. Copeland, The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31341–31346.
- [62] M.V. Ponamarev, M.J. Longley, D. Nguyen, T.A. Kunkel, W.C. Copeland, Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 15225–15228.
- [63] M.A. Graziewicz, M.J. Longley, R.J. Bienstock, M. Zeviani, W.C. Copeland, Structure–function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 770–776.
- [64] N. Luo, L.S. Kaguni, Mutations in the spacer region of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase affect DNA binding, processivity, and the balance between Pol and Exo function, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2491–2497.
- [65] E. Lefai, M.A. Fernández-Moreno, A. Alahari, L.S. Kaguni, R. Garesse, The expression of the catalytic and accessory subunits of the mitochondrial DNA polymerase are differentially regulated in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33123–33133.
- [66] K. Takata, Y.H. Inoue, F. Hirose, S. Murakami, K. Shimanouchi, I. Sakimoto, K. Sakaguchi, Spatio-temporal expression of *Drosophila* mitochondrial transcription factor A during development, *Cell Biol. Int.* 27 (2003) 361–374.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/content/suppl/2010/11/10/M110.188805.DC1.html>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 1, PP. 555–566, JANUARY 7, 2011
 © 2011 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PRINTED IN THE U.S.A.

Cox25 Teams Up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to Regulate Mitochondrial Cytochrome *c* Oxidase Subunit 1 Expression and Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*^{*[S]}

Received for publication, September 26, 2010, and in revised form, November 8, 2010. Published, JBC Papers in Press, November 10, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.188805

Flavia Fontanesi[‡], Paula Clemente^{§1}, and Antoni Barrientos^{‡¶1,2}

From the Departments of [‡]Neurology and [¶]Biochemistry and Molecular Biology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida 33136 and the [§]Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28029, Spain

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondrial cytochrome *c* oxidase (COX) biogenesis is translationally regulated. Mss51, a specific COX1 mRNA translational activator and Cox1 chaperone, drives the regulatory mechanism. During translation and post-translationally, newly synthesized Cox1 physically interacts with a complex of proteins involving Ssc1, Mss51, and Cox14, which eventually hand over Cox1 to the assembly pathway. This step is probably catalyzed by assembly chaperones such as Shy1 in a process coupled to the release of Ssc1-Mss51 from the complex. Impaired COX assembly results in the trapping of Mss51 in the complex, thus limiting its availability for COX1 mRNA translation. An exception is a null mutation in COX14 that does not affect Cox1 synthesis because the Mss51 trapping complexes become unstable, and Mss51 is readily available for translation. Here we present evidence showing that Cox25 is a new essential COX assembly factor that plays some roles similar to Cox14. A null mutation in COX25 by itself or in combination with other COX mutations does not affect Cox1 synthesis. Cox25 is an inner mitochondrial membrane intrinsic protein with a hydrophilic C terminus protruding into the matrix. Cox25 is an essential component of the complexes containing newly synthesized Cox1, Ssc1, Mss51, and Cox14. In addition, Cox25 is also found to interact with Shy1 and Cox5 in a complex that does not contain Mss51. These results suggest that once Ssc1-Mss51 are released from the Cox1 stabilization complex, Cox25 continues to interact with Cox14 and Cox1 to facilitate the formation of multisubunit COX assembly intermediates.

Eukaryotic cells rely on the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system for aerobic ATP pro-

duction. Cytochrome *c* oxidase (COX)³ is a heme A-copper terminal oxidase. It is the last enzyme of the respiratory chain and plays fundamental roles both in electron transfer from reduced cytochrome *c* to molecular oxygen and in proton pumping through the inner mitochondrial membrane to contribute to the generation of a proton gradient in the intermembrane space that is subsequently used by the F₁F₀-ATP synthase to drive synthesis of ATP. COX biogenesis is complicated by its dual genetic origin, with subunits (11 in yeast and 13 in mammals) encoded both in the organelle and in the nucleus. In most cases, the three subunits forming the catalytic core of the enzyme (subunits 1–3) are encoded in the mitochondrial DNA. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, COX assembly requires the assistance of at least 30 nuclear gene products acting at all stages of the assembly process (1, 2).

COX assembly requires the accumulation of its constitutive subunits in a defined stoichiometric ratio. Previous studies led to the notion of two mechanisms responsible for the concerted accumulation of COX subunits in yeast mitochondria. First, most unassembled COX subunit 1 and the other highly hydrophobic core subunits 2 and 3 are very efficiently post-translationally degraded (3). Second, Cox1 is subject to assembly-controlled translational auto-regulation (4–9). This kind of translational regulation was initially found to operate in the assembly of photosynthetic complexes in chloroplasts from the alga *Chlamydomonas reinhardtii* (10, 11) and in higher plants (12) and termed control by epistasis of synthesis. A distinctive characteristic of these organellar translational auto-regulatory systems is the involvement of ternary factors, mRNA-specific translational activators, whose availability would be regulated by the specific gene products. In the case of yeast COX, the ternary factor is Mss51, a specific translational activator of COX1 mRNA (4–9).

Mss51 acts on the 5'-UTR of COX1 mRNA to promote translation initiation (4, 7) and additionally acts on a target in the protein coding sequence of COX1 mRNA, perhaps to promote elongation (4). During Cox1 synthesis on the mitoribosomes, Mss51 and newly synthesized Cox1 form a transient complex (4, 6) that is stabilized by Cox14 (6), the mitochondrial hsp70 chaperone Ssc1, and its co-chaperone Mdj1 (8).

^{*} This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grant GM071775A (to A. B.). This work was also supported by a research grant from the Muscular Dystrophy Association (to A. B.) and a development grant from the Muscular Dystrophy Association (to F. F.).

^[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S4.

¹ Recipient of a research contract from the Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid y Fondo Social Europeo and of a predoctoral fellowship for mobility from the Universidad Autónoma de Madrid (under the mentorship of Dr. Rafael Garesse).

² To whom correspondence should be addressed: Dept. of Neurology and Biochemistry & Molecular Biology, University of Miami, Miller School of Medicine, 1600 NW 10th Ave., RMSB # 2067, Miami, FL 33136. Tel.: 305-243-86-83; Fax: 305-243-39-14; E-mail: abarrientos@med.miami.edu.

³ The abbreviations used are: COX, cytochrome *c* oxidase; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine.

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

TABLE 1

Genotypes and sources of yeast strains carrying null alleles of COX-related genes

The categories indicate the general function of the deleted genes in COX biogenesis.

Strain	Genotype	Source
Wild-type BY4741 W303-1A	MATa <i>his3D1 leu2D0 met15D0, ura3D0</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	^a ^b
COX structural subunits W303Δ <i>cox1</i> W303Δ <i>cox5a</i>	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cox1</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcox5a::HIS3</i>	Ref. 7 Ref. 38
COX1 expression W303D <i>pet309</i> W303D <i>mss51</i>	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dpet309::HIS3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dmss51::HIS3</i>	Ref. 38 Ref. 5
COX2 expression W303D <i>pet111</i>	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dpet111::HIS3</i>	Ref. 39
Heme A biosynthesis W303D <i>cox10</i> W303D <i>cox15</i>	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcox10::HIS3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcox15::HIS3</i>	Ref. 40 Ref. 41
Maturation of CuA or CuB centers W303D <i>cox11</i> W303D <i>cox17</i> W303D <i>sco1</i>	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcox11::HIS3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcox17::TRP1</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dsco1::URA3</i>	Ref. 42 Ref. 43 Ref. 44
COX assembly/unknown W303D <i>shy1</i> W303D <i>doxa1</i> W303D <i>coa1</i> W303D <i>cox16</i>	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dshy1::URA3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Ddoxa1::HIS3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcoa1::KanMX4</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcox16::URA3</i>	Ref. 5 Ref. 45 Ref. 15 Ref. 46
W303Δ<i>pet100</i> W303D <i>pet191</i> W303Δ <i>cox14</i> BYD <i>cox25</i> W303D <i>cox25</i>	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dpet100::HIS3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dpet191::HIS3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcox14::TRP1</i> MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0, ura3Δ0 Dcox25::KanMX</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Dcox25::KanMX</i>	Ref. 6 Ref. 6 Ref. 6 ^a This work
Other strains W303D <i>cox25Δshy1</i> W303Δ <i>cox11Δmss51</i> W303D <i>cox25Δcox14</i> W303D <i>cox25Δcox11</i> W303-1A/ρ ⁰	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δcox25::KanMX Dshy1::URA3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δcox11::KanMX Dmss51::HIS3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δcox25::KanMX Dcox14::TRP1</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δcox25::KanMX Δcox11::HIS3</i> MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1/ρ⁰</i>	This work This work This work This work Ref. 7

^a Strains purchased from Open Biosystems.

^b Dr. R. Rothstein (Department of Human Genetics, Columbia University, New York, NY).

Following Cox1 synthesis, the Ssc1-Mss51-Cox1-Cox14 complex remains stable until Cox1 proceeds to downstream assembly steps. We have postulated that these interactions down-regulate Cox1 synthesis when COX assembly is impaired by trapping Mss51 and limiting its availability for COX1 mRNA translation (6, 8). The C-terminal residues of Cox1 have recently been shown to be essential for Mss51 sequestration and to stabilize the Mss51-Cox14 interaction (9). We have shown that when Mss51 is released from the complex, it is still in a very stable binary complex with Ssc1 (8). According to this model, the release of Mss51-Ssc1 from the post-translational complex and Mss51 availability for Cox1 synthesis (8) probably occur when Cox1 acquires its prosthetic groups or interacts with other COX subunits, a step possibly catalyzed by Shy1, a protein involved in maturation and/or assembly of Cox1 (6, 13, 14). Coa1 could also participate in Cox1 maturation. Coa1 has been proposed to stabilize the Cox1-Ssc1-Mss51-Cox14 complex prior to its interaction with Shy1 (13, 15); however, we and others did not find Coa1 as part of Mss51-containing complexes (8, 16). Independently, once Mss51 is released from the Cox1 preassembly complex, Cox14 still interacts with increasingly matured COX assembly intermediates (13, 15).

To gain insight into how Mss51 is recycled from its post-translational function to become available for COX1 mRNA translation and to fully clarify how this regulatory mechanism

operates, we recently analyzed protein-interacting partners of Mss51 in wild-type and a collection of COX assembly mutants (8). These studies allowed us to identify Ssc1 as an important Mss51 partner, a partnership that could mediate the coordination of the translational and post-translational Mss51 functions (8). Mass spectrometric analyses of Mss51-containing complexes allowed us to identify additional proteins that could be potential candidates to participate in these processes. In the present study, we provide evidence that one of them, encoded in open reading frame YJL062W-A and here termed Cox25, is part of Mss51-containing Cox1 translational and preassembly complexes and is essential for their stability. Following Mss51 release from the Cox1 preassembly complex, Cox25 remains involved and becomes part of complexes containing Shy1 and the nuclear encoded subunit Cox5. We conclude that Cox25 and Cox14 work together toward coordinating the assembly line of Cox1 with the incorporation of additional subunits during COX biogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains and Media—The genotypes and sources of the *S. cerevisiae* strains carrying null alleles of COX-related genes are listed in Table 1. A Δ*cox25* mutant in the BY4741 background created by replacement of the full COX25 gene with a KANMX cassette was obtained from Open Biosystems/Thermo Scientific (Huntsville, AL). The KANMX cassette and

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

flanking sequences of the *COX25* gene were PCR-amplified using primers: 5'-GCGCCTTGTCCCTAGAGAG-3' and 5'-GAAGTGTGCGTGGTAGATGAAC-3'. The amplicon was transformed into a W303-1A wild-type strain to create W303 Δ *cox25*. The Δ *mss51* and Δ *cox14* null mutants transformed with an integrative plasmid containing fusion genes expressing Mss51-GST and Cox14-GST, respectively, were previously reported (6). The Δ *cox25* null mutant was transformed with an integrative plasmid containing fusion gene expressing functional Cox25-GST (supplemental Fig. S1). Wild-type and mutant strains were transformed with an episomal plasmid (YEplac181) overexpressing *COX25*. Double mutants involving Δ *cox25* were constructed by crosses of the single mutants. The compositions of the growth media have been described elsewhere (17). The following media were used routinely to grow yeast: YPD (2% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone), YPGal (2% galactose, 1% yeast extract, 2% peptone), and YPEG (2% ethanol, 2% glycerol, 1% yeast extract, 2% peptone).

Characterization of Yeast Mitochondrial Respiratory Chain—Endogenous cell respiration was assayed in whole cells in the presence of galactose using a Clark type polarographic oxygen electrode from Hansatech Instruments (Norfolk, UK) at 24 °C as described (5). Mitochondria were prepared from strains grown in media containing 2% galactose plus 0.5% glucose according to the method of Faye *et al.* (18) except that zymolyase 20T (ICN Biochemicals Inc., Aurora, OH) instead of glucylase was used for the conversion of cells to spheroplasts. Mitochondria were used to measure oxygen consumption in the presence of either NADH or succinate as the substrates as reported (14). The specific activities reported were corrected for KCN-insensitive respiration.

Mitochondria prepared from the different strains were used for spectrophotometric assays carried out at 24 °C to measure KCN-sensitive COX activity, antimycin A-sensitive NADH cytochrome *c* reductase, and succinate cytochrome *c* reductase activities and oligomycin-sensitive ATP synthase activity, measured as described (5, 19). Total mitochondrial cytochrome spectra were obtained as reported (20).

In Vivo and in Organello Mitochondrial Protein Synthesis—Mitochondrial gene products were labeled with [³⁵S]methionine in whole cells at 30 °C in the presence of cycloheximide (5). For *in organello* translation, mitochondria were prepared by the method of Herrmann *et al.* (21) and labeled with [³⁵S]methionine as described (14). Equivalent amounts of total cellular or mitochondrial proteins were separated by SDS-PAGE on a 17.5% polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and exposed to x-ray film.

Preparation of Antibodies to Cox25—A rabbit polyclonal antibody was obtained against a C-terminal Cox25 peptide (DPQELKKEYEAKKKA) using the services of Open Biosystems/Thermo Scientific (Huntsville, AL).

Sucrose Gradients—The sedimentation properties of Cox25 and Mss51 in sucrose gradients were analyzed essentially as described (6). Mitochondria were prepared by the method of Herrmann *et al.* (21). Four mg of protein were solubilized in 400 μ l of extraction buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 0.5 mM PMSF, 1% digitonin, 1.2 mM MgCl₂, and 150 mM KCl) on ice

for 30 min. The clarified extract obtained by centrifugation at 50,000 \times g_{av} for 15 min was mixed with hemoglobin and lactate dehydrogenase and applied to 5 ml of linear 7–20% sucrose gradient containing 20 mM HEPES, 0.5 mM PMSF, 0.1% digitonin, 1.2 mM MgCl₂, and 150 mM KCl. Following centrifugation for 12 h at 28,000 r.p.m. in a Beckman 55Ti rotor, the gradients were collected in 14 equal fractions. Each fraction was subsequently assayed for hemoglobin by absorption at 409 nm, and for lactate dehydrogenase activity by measuring NADH-dependent conversion of pyruvate to lactate. The distribution of Cox25, Cox14, and Mss51 was assayed by Western blot analysis. The mass of Cox25 was determined from the positions of the respective peaks relative to those of the markers (22). All of the gradients were performed at least in triplicate using independent mitochondrial preparations. The gradients reported are representative of each strain because the patterns observed were reproducible.

Construction of COX25-GST Chimera—The construction of a plasmid containing chimeric COX25-GST was performed in two steps. First, the *GST* gene was amplified by PCR and second, cloned in-frame to the *COX25* gene into a plasmid already containing it. The *GST* gene plus a thrombin cleavage site at its N terminus was amplified from pGEX-3X (Amersham Biosciences) with primers 5'-GGCTGCAGCTGGTTC-CGCGTGGATCCGAGGAATGTCCCCTATACTAGGT and 5'-CCGGGAGCTCGGATCCACGCGGAACCA-GATCC. The ~600-bp product was digested with PstI/SacI and kept until used for further cloning. The *COX25* gene was amplified with the primers 5'-GGCCGAATTCGACTTGAC-TAACAGCCACATC-3' and 5'-GGCCCTGCAGTGCCT-TCTTCTTGGCTTCGTACTCC-3' using total DNA isolated from wild-type W303 cells as the template and cloned as an EcoRI/PstI fragment into YIp352 (23). The previously amplified *GST* gene was subsequently cloned into this plasmid as PstI-SacI, in-frame with the 3'-end of *COX25* to yield YIp352/*COX25-Thr-GST*.

GST Pulldown—A functional Mss51 fused with GST with an intercalated thrombin site was expressed from an integrative plasmid in a strain carrying a null mutant allele of *mss51* (Δ *mss51*/*MSS51-GST*) and in the double mutant Δ *mss51* Δ *cox11* (Δ *mss51* Δ *cox11*/*MSS51-GST*) as previously reported (6). Mitochondria were prepared from the Δ *mss51*/*MSS51-GST* and the Δ *mss51* Δ *cox11*/*MSS51-GST* strains by the method of Herrmann *et al.* (21). Mitochondrial proteins (24 mg) were solubilized in 20 mM HEPES, pH 7.4, 0.5 mM PMSF, 1% digitonin, 1.2 mM MgCl₂, and 150 mM KCl, and the extracts were loaded in six sucrose gradients. After centrifugation, 14 equal fractions were collected from each gradient; the equivalent fractions were pooled and tested for Mss51 distribution by Western blot analyses. Three fractions around each peak were pooled and used for GST pulldown experiments as reported (8). Each set of pooled fractions were incubated in a rotator with glutathione-Sepharose beads for 4 h at 4 °C. After centrifugation at 500 \times g_{av} for 5 min, the beads were washed three times with cold PBS. The Mss51-GST fusion protein was eluted with 10 mM reduced glutathione, 50 mM Tris-base, pH 8.0. Samples from the different pulled

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

down materials were used for Western blot analyses using antibodies against Cox25 and Mss51.

Cox25 fused with GST with an intercalated thrombin site was expressed from YIp352/*COX25-Thr-GST* in a W303 Δ *cox25* strain. This strain was respiratory competent and grew on nonfermentable carbon sources with a doubling time similar to the parental wild-type strain (supplemental Fig. S1). A functional Cox14 fused with GST with an intercalated thrombin site was expressed from an integrative plasmid in a strain carrying a null mutant allele of *cox14* (Δ *cox14*/*COX14-GST*) as previously reported (6). Mitochondria were prepared from W303 Δ *cox14*/*COX14-Thr-GST*, W303 Δ *cox25*/*COX25-Thr-GST*, and W303 Δ *mss51*/*MSS51-Thr-GST* strains by the method of Herrmann *et al.* (21), solubilized as mentioned above and directly used for GST pulldown followed by Western blot analyses of the pulled down material.

Pulldown of Newly Synthesized Mitochondrial Products with Cox25-GST—Mitochondria were prepared from a *cox25* null mutant with a chromosomally integrated plasmid expressing the Cox25-GST fusion protein. Mitochondria were labeled with [³⁵S]methionine for 30 min as described (6) and extracted with 1% digitonin, 20 mM HEPES, pH 7.4, 1.2 mM MgCl₂, 150 mM KCl, and 0.5 mM PMSF. The extract was clarified by centrifugation at 50,000 × *g*_{av} for 30 min and incubated with glutathione-Sepharose beads for 4 h at 4 °C. Following centrifugation at 500 × *g*_{av} for 5 min, the supernatant was collected, the beads were washed three times with PBS and eluted with Laemmli buffer (24). Mitochondria corresponding to 20 μg of protein, equivalent volumes of the extract, the supernatant from the glutathione-Sepharose beads, and the washed beads were separated on a 17.5% polyacrylamide gel by SDS-PAGE.

Cox25 Localization and Topology in Isolated Mitochondria—A sample of mitochondria at 4 mg/ml was gently sonically irradiated and centrifuged at 50,000 × *g*_{av} for 30 min at 4 °C to separate the soluble and membrane proteins. The membrane pellet was resuspended in 0.6 M sorbitol, 20 mM HEPES buffer containing 0.1 M Na₂CO₃, pH 11, and 50 mM EDTA. After 30 min on ice, the sample was centrifuged at 100,000 × *g*_{av} for 15 min at 4 °C to separate the soluble membrane extrinsic from the insoluble intrinsic membrane proteins. Equivalent volumes of each fraction were analyzed by Western blotting.

Miscellaneous Procedures—Standard procedures were used for the preparation and ligation of DNA fragments and for transformation and recovery of plasmid DNA from *Escherichia coli* (25). Yeast were transformed by the method of Schiestl and Gietz (26). The proteins were separated by SDS-PAGE in the buffer system of Laemmli (24), and Western blots were treated with antibodies against the appropriate proteins followed by a second reaction with anti-mouse or anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma). The SuperSignal chemiluminescent substrate kit (Pierce) was used for the final detection. *In vivo* mitochondrial protein synthesis was performed as previously described (5, 8). The one-step gene insertion method (27) was used to integrate linear plasmids at the *URA3* or *LEU2* locus of yeast chromosomal DNA.

Statistical Analysis—All of the experiments were done at least in triplicate. The data are presented as the means ± S.D. of absolute values or percentages of control. The values obtained for wild-type and *cox25* mutant strains for the different parameters studied were compared by Student's *t* test. *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Identification of Cox25—Mass spectrophotometry analyses of a 450-kDa protein complex containing Mss51, Cox14, and newly synthesized Cox1 allowed us to identify the presence of the mitochondrial Hsp70 chaperone Ssc1 in this complex (8). Peptides from the protein encoded in the gene corresponding to ORF YJL062W-A were also detected in some of our replica samples. Recently, Merz and Westermann (28) reported a genome-wide deletion mutant analysis that revealed a number of new genes required for respiratory growth in *S. cerevisiae*. One of these genes is encoded in ORF YJL062W-A, and it was termed *RRG10* (28). Rrg10 was proposed to be involved in the expression of mitochondrial proteins based on the attenuation of [³⁵S]methionine incorporation into Cox1 during *in vivo* mitochondrial protein synthesis using a deletion mutant of *rrg10* (28). The precise function of Rrg10 is not known at present. As explained below, we have shown that Rrg10 is a COX assembly factor that acts early in Cox1 metabolism and, together with Mss51, Cox14, and Ssc1, operates in translational regulation of *COX1* mRNA. For these reasons, we have renamed the gene *COX25*. A Blast search identified homologues of the *COX25* product only among fungi (Fig. 1A).

COX25 Is Essential for Respiration, Cytochrome *c* Oxidase Assembly, and Function—We obtained a BY Δ *cox25* strain from Open Biosystems in which the *COX25* gene was replaced by a *KANMX* cassette in the BY4741 background. The *cox25* deletion cassette was transferred to a W303-1A strain to create a W303 Δ *cox25* strain, which was used for most of the experiments. The *cox25* mutants in either background are able to use glucose (Fig. 1B) and less efficiently other fermentable nonrepressive carbon sources (supplemental Fig. S2) but are unable to utilize respiratory substrates for growth (Fig. 1B and supplemental Fig. S2). Overexpression of Cox25 did not affect the growth of wild-type cells and fully restored the respiratory growth of Δ *cox25* cells (Fig. 1C).

The respiratory growth defect of Δ *cox25* cells is due to a virtually complete abolishment of the capacity of the cells to respire as shown by a polarographic measurement of KCN-sensitive endogenous cell respiration (Fig. 2A). The ability of the mutant cells to respire was restored by reinsertion of recombinant *COX25* (data not shown). The respiratory defect was also evident by the complete inability of mitochondria isolated from W303 Δ *cox25* cells to oxidize either NADH or succinate (Fig. 2B).

To ascertain whether the origin of the respiratory defect stemmed from a defect in the respiratory chain enzymes, we analyzed the oxidized *minus* reduced total mitochondrial cytochrome spectra. Comparison of the wild-type and mutant spectra revealed slight differences in the levels of cytochromes *b*, *c*, or *c*₁. More importantly, cytochromes *a* and *a*₃ were absent in the Δ *cox25* mutant compared with the wild-type strain

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

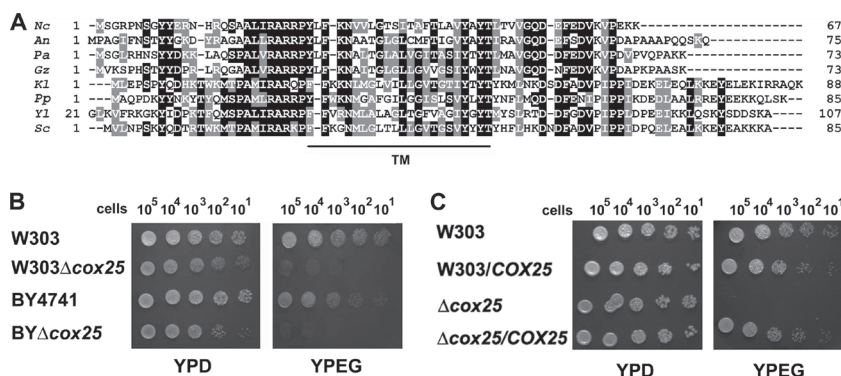


FIGURE 1. *S. cerevisiae* COX25 codes for a protein required for respiratory growth. **A**, sequence alignment of COX25 from *S. cerevisiae* (Sc) and other fungi: *Neurospora crassa* (Nc), *Aspergillus nidulans* (An), *Podospora anserina* (Pa), *Gibberella zeae* (Gz), *Kluiveromyces lactis* (Kl), *Pichia pastoris* (Pp), and *Yarrowia lipolytica* (Yl). TM indicates a predicted transmembrane domain. **B**, the respiratory competent wild-type strains BY4741 and W303 and strains carrying a null allele of *cox25* in both genetic backgrounds were grown overnight in liquid YPD media. 10-fold serial dilutions of the four strains were plated on solid YPD or YPEG media and incubated at 30 °C. The pictures were taken after 3 days of incubation. **C**, wild-type W303 and mutant Δ*cox25* cells overexpressing or not COX25 were grown overnight in liquid YPD media. Serial dilution growth test was performed as for **B**.

(Fig. 2C), indicating a complete COX impairment. The enzymatic defect was confirmed by measuring COX activity in isolated mitochondria, which indicated a complete absence of functional COX in the mutant as compared with the isogenic wild type (Fig. 2D). The Δ*cox25* mutation also induced a pleiotropic decrease in other segments of the OXPHOS system, particularly in NADH cytochrome *c* reductase and ATP synthase activities (Fig. 2D). Although the precise mechanisms for these pleiotropic effects remain to be explored, they were similar to the alterations measured in a Δ*cox14* strain (Fig. 2D) and several other COX assembly mutants (29).

Steady state levels of Cox1 and Cox2 were barely detected in the Δ*cox25* mutant, and those of Cox3 were significantly reduced (Fig. 2E). This is most likely due to the rapid turnover of the COX catalytic core subunits when the assembly process is hindered. Like in most COX mutants, including Δ*cox14*, a less significant difference was detected in the more stable nuclear encoded subunits such as Cox4 (Fig. 2E). However, the steady state levels of Cox5 were particularly low in the absence of Cox25 (Fig. 2E), and the two subunit isoforms, Cox5a and Cox5b, were similarly affected (Fig. 2F).

A Null Mutation in COX25 Does Not Repress Cox1 Synthesis—The Δ*cox25* mutation in the BY4741 background was previously reported to induce a Cox1 synthesis defect (28). This phenotype likely results from a down-regulation of Cox1 synthesis when normal COX assembly is compromised as has been reported for most COX assembly mutants (6). However, *in vivo* pulse labeling with [³⁵S]methionine of either BYΔ*cox25* or W303Δ*cox25* cells in the presence of cycloheximide showed that the amount of detectable newly synthesized Cox1 is similar in Δ*cox25* and wild-type cells (Fig. 3A). To date, the two reported exceptions of genes that when mutated bypass Cox1 synthesis down-regulation in the absence of COX assembly are Cox14 (6) and Coa1 (13, 15).

The lack of effect of the *cox25* mutation on Cox1 synthesis (Fig. 3, A and B) suggested that similar to Cox14, Cox25 might contribute to negatively regulate translation of this COX subunit. This was tested by measuring Cox1 synthesis in strains carrying mutations in *cox25* and other COX-specific

genes including *cox11* (Fig. 3B), *mss51*, *pet309*, and *shy1* (data not shown). The *cox25* mutation restored normal Cox1 synthesis in all the COX mutants except in strains carrying null alleles of *mss51* and *pet309*, genes that encode the two translational activators essential for Cox1 synthesis. Despite being epistatic with respect to Cox1 expression, the *cox25* mutation did not rescue either respiration or the ability of the mutants to assemble COX (data not shown). The observed phenotype is not the result of a decrease in Cox14 steady state levels, which were not modified by the absence of Cox25 (Fig. 3C).

Stability of Newly Synthesized Cox1p in Wild-type and COX Mutants—We have reported that in the absence of Cox14, newly synthesized Cox1 is rapidly degraded because the presence of Cox14 is required to stabilize a high molecular mass protein complex additionally containing newly synthesized Cox1, the COX1 mRNA translational activator Mss51, and the mitochondrial Hsp70 chaperone Ssc1 (6, 8). To assess the stability of unassembled Cox1 in the absence of Cox25, wild-type W303, Δ*cox25*, and double mutant Δ*cox14*Δ*cox25* cells were pulsed with [³⁵S]methionine for 15 min in the presence of cycloheximide and chased for different times following addition of puromycin and excess of cold methionine. Most of the translation products in the wild-type strain, including the three COX subunits, were stable during 1 h of chase (Fig. 3D). In the mutants, most of the Cox1 was degraded during the chase, and a significant fraction of Cox2 and Cox3 was also degraded during this period (Fig. 3D). This is in contrast with the pattern of most COX assembly mutants in which Cox1 synthesis is down-regulated, but the small amount of labeled Cox1 detected in these mutants remains unchanged during the chase, whereas Cox2 and Cox3 are labile (6). The greater instability of Cox1 in the *cox25* mutant mimics that in the *cox14* mutant and is also supported by the results of Western analysis showing barely detectable Cox1 steady state concentrations in these two mutants (Fig. 2E) even lower than in other COX assembly mutants (6).

A double Δ*cox25*Δ*cox14* mutation produced a bypass of Cox1 translational autoregulation similar to that produced by the single mutations (Fig. 3, A and D) and a similar instability

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

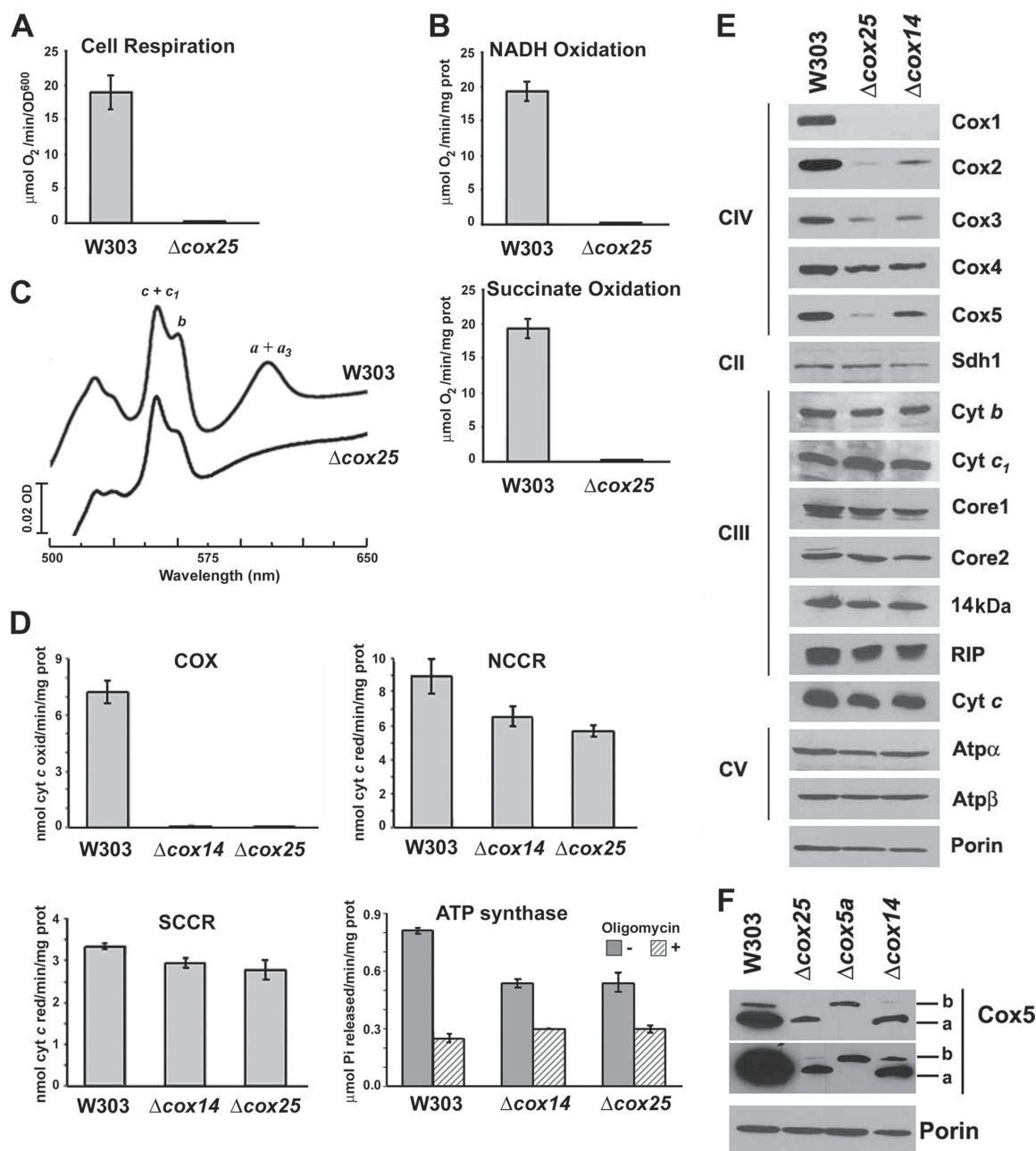


FIGURE 2. Biochemical properties of Δcox25 cells. Respiratory assays *A*, KCN-sensitive endogenous cell respiration measured polarographically in the presence of galactose. *B*, rate of NADH and succinate oxidation in isolated mitochondria. *C*, total mitochondrial cytochrome spectra. Mitochondria from the wild-type strain W303 and the null mutant Δcox25 cells were extracted at a protein concentration of 5 mg/ml with potassium deoxycholate under conditions that quantitatively solubilize all of the cytochromes (36). Difference spectra of the reduced (sodium dithionite) versus oxidized (potassium ferricyanide) extracts were recorded at room temperature. The absorption bands corresponding to cytochromes *a* and *a*₃ have maxima at 603 nm (*a* and *a*₃); the maxima for cytochrome *b* (*b*) and for cytochrome *c* and *c*₁ (*c* and *c*₁) are 560 and 550 nm, respectively. *D*, mitochondrial respiratory chain enzyme spectrophotometric measurements in isolated mitochondria. COX, NADH cytochrome *c* reductase (NCCR), succinate cytochrome *c* reductase (SCCR), and ATP synthase activities were measured as described under "Experimental Procedures." *E*, steady state concentrations of mitochondrial respiratory chain complexes IV (COX), II (Sdh), and III (*bc*₁ complex) and ATP synthase subunits estimated by Western blot analyses of proteins separated in a 12% Tris-glycine SDS-PAGE. *F*, steady state concentrations of COX subunit 5 isoforms estimated by Western blot analyses of proteins separated in a 16.5% Tris-Tricine SDS-PAGE. Two expositions of the film are shown. In *E* and *F*, an antibody against porin was used to normalize the signals for protein loading.

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

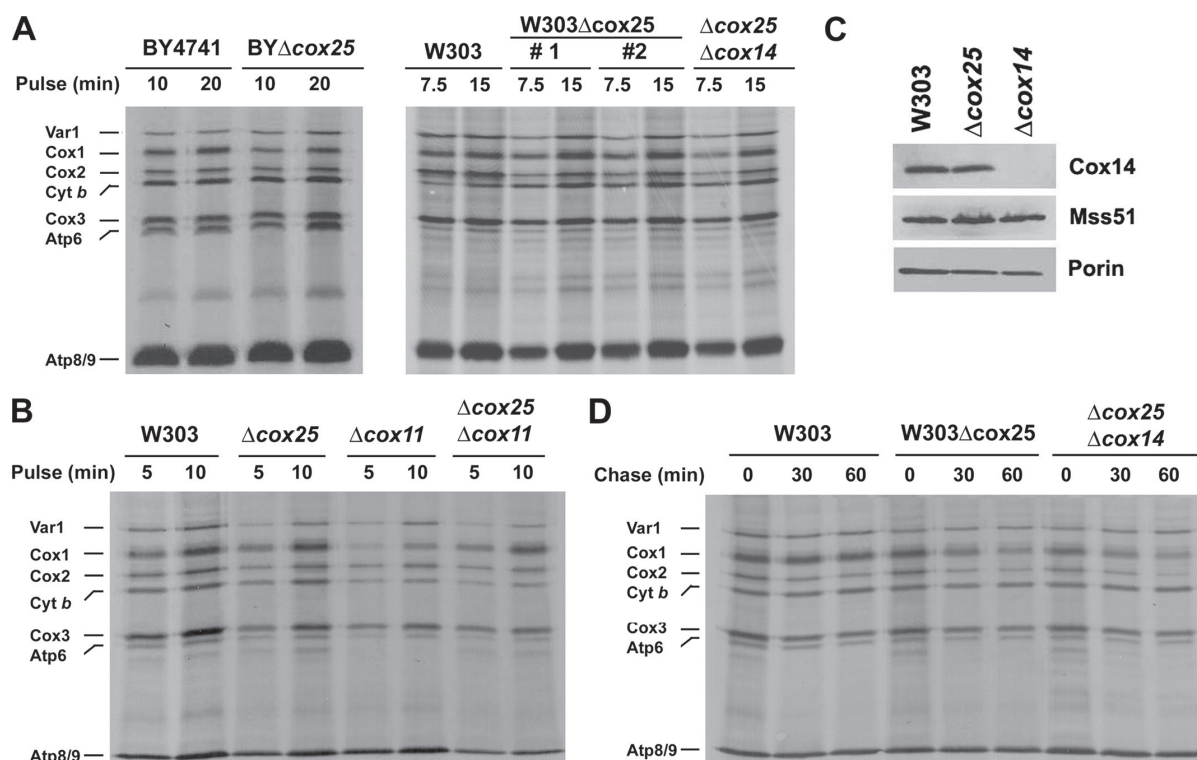


FIGURE 3. *In vivo* synthesis and turnover of mitochondrial gene products in Δ cox25 cells. *A*, wild type (either BY4741 or W303), null mutants of *cox25* in both backgrounds and a double mutant Δ cox25 Δ cox14 were labeled with [35 S]methionine at 30 °C for the indicated times in the presence of cycloheximide. Equivalent amounts of protein were separated by SDS-PAGE on a 17.5% polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and analyzed by autoradiography. #1 and #2 indicate two independent Δ cox25 clones. *B*, *in vivo* labeling of mitochondrial products from the indicated strains with [35 S]methionine at 30 °C for 5 and 10 min in the presence of cycloheximide. *C*, steady state levels of Cox14 and Mss51 in mitochondria isolated from wild-type, Δ cox25, and Δ cox14 cells analyzed by Western blotting. *D*, the indicated strains were labeled for 15 min at 30 °C with [35 S]methionine in the presence of cycloheximide. Labeling was terminated by the addition of 80 μ mol of cold methionine and 12 μ g/ml puromycin (0 time). The samples were collected after the indicated times of incubation at 30 °C and processed as in *A*.

of newly synthesized Cox1 (Fig. 3D), suggesting that both Cox25 and Cox14 contribute to establish Cox1 translational control jointly or through the same mechanism.

Overexpression of Cox25 Does Not Alter Synthesis of Cox1—Normal labeling of Cox1 in *cox25* single and double mutants could indicate that Cox25 acts to increase degradation of unassembled or incompletely assembled Cox1. If this were the case, overexpression of Cox25 in a wild-type or mutant background might be expected to affect the amount of newly synthesized Cox1. This was examined by transforming wild-type and Δ cox25 cells with an episomal plasmid containing a wild-type COX25 gene. Overexpression of Cox25 in these strains was more than 10-fold (supplemental Fig. S3A). It did not affect the growth of wild-type cells, fully restored the respiratory growth of Δ cox25 cells (Fig. 1C), and did not affect *in vivo* labeling of Cox1, similar to Cox14 overexpression in the wild-type strain (supplemental Fig. S3B).

The Function of Cox25 Does Not Overlap the Functions of Other COX Assembly Factors—Because Cox25 seems to act early in the biogenesis of Cox1, we asked whether overexpression of COX assembly factors could at least partially restore respiratory growth in Δ cox25 cells. Overexpression of Mss51, Cox14, Cox10, Shy1, Cox11, Cox17, and Sco1 as well as over-

expression of cytochrome *c*, the presence of which is required for COX assembly, and overexpression of Hap4, which partially rescues the COX deficiency of *shy1* mutants by inducing overexpression of nuclear encoded subunits Cox5 and Cox6 (14), failed to suppress the Δ cox25 respiratory defect (data not shown). Reciprocally, overexpression of COX25 in strains carrying null alleles of *cox14*, *mss51*, *cox10*, *cox15*, *oxa1*, *pet309*, *pet111*, *pet100*, *pet191*, *shy1*, *sco1*, *cox11*, *cox16*, *cox17*, and *cox5a* did not rescue the respiratory defect of these strains (data not shown).

Cox25 Is an Integral Mitochondrial Inner Membrane Protein—The phenotype of Δ cox25 cells strongly suggested that Cox25 must be a mitochondrial protein. Cox25 is a 10-kDa protein predicted to have a single transmembrane domain. To determine the subcellular localization of Cox25, we have generated an affinity-purified peptide antibody that recognizes this protein. Cell fractionation and Western blot analyses enabled us to find Cox25 in the mitochondrial fraction but not in the postmitochondrial supernatant containing cytoplasmic proteins such as Pgk1 (3-phosphoglycerate kinase) (Fig. 4A, upper panel). The protein was absent in the Δ cox25 strain (Fig. 4A, lower panel). We have determined the submitochondrial localization of Cox25, its topology, and its solubil-

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

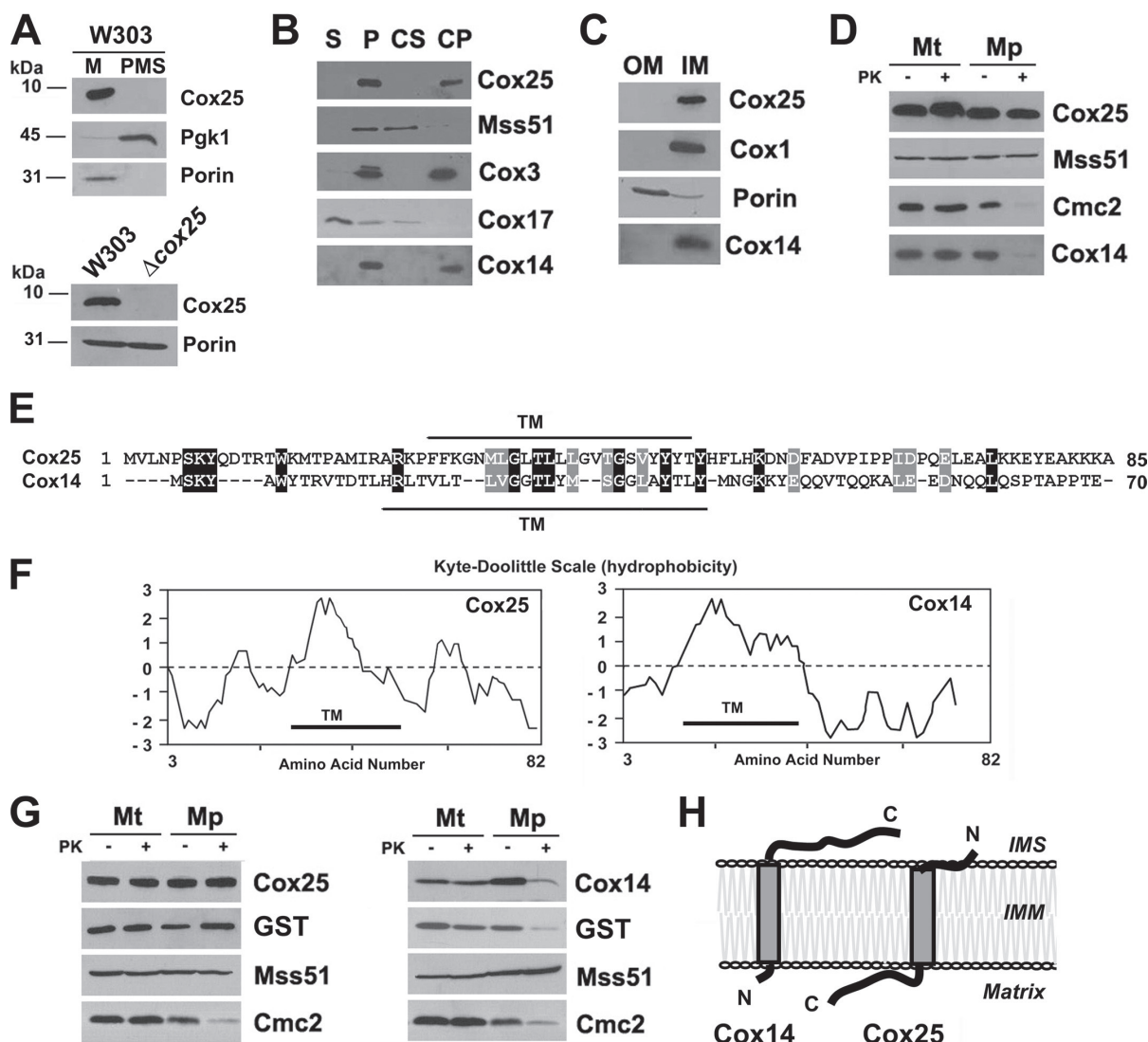


FIGURE 4. Mitochondrial localization of Cox25. *A*, Cox25 is a mitochondrial protein. Mitochondria (*M*) and the post-mitochondrial supernatant (*PMS*) fraction were isolated from the wild-type W303 strain. Samples of the two fractions corresponding to 40 μ g of protein were analyzed by Western blotting using antibodies against Cox25, the cytosolic marker 3-phosphoglycerate kinase subunit 1 (*Pgk1*), and the mitochondrial marker porin. The specificity of the signal detected with the anti-Cox25 antibody was tested by including a sample of Δ cox25 mitochondria. *B*, Cox25 is a membrane protein. As described under "Experimental Procedures," soluble (*S*) and membrane-bound (*P*) mitochondrial proteins were separated from 40 μ g of total wild-type mitochondria. The pellet was submitted to alkaline extraction to allow the separation of the extrinsic proteins present in the supernatant (*CS*) from the intrinsic proteins in the pellet (*CP*). The samples were analyzed by Western blotting using antibodies against Cox25, Cox14, the inner membrane extrinsic protein Mss51, the soluble intermembrane space protein Cox17, and the inner membrane intrinsic protein Cox3. *C*, Cox25 is an inner mitochondrial membrane protein. Isolated mitochondria were fractionated into inner and outer membranes by sonication plus sucrose gradient sedimentation as described (37). Inner membranes (*IM*) and outer membranes (*OM*) were analyzed by Western blotting using antibodies against porin (outer membrane marker), Cox1 (inner membrane marker), Cox14, and Cox25. *D*, Cox25 is a membrane protein facing the matrix. Four aliquots of 40 μ g of mitochondrial protein were pelleted and resuspended in buffer containing either 20 mM HEPES or 0.6 M sorbitol with 20 mM HEPES. One aliquot in each buffer was supplemented with final 100 μ g/ml proteinase K (*PK*) and incubated on ice for 60 min. The reaction was stopped with 2 mM PMSF. Mitochondria (*Mt*) and mitoplasts (*Mp*) were recovered by centrifugation at 50,000 \times g_{av} for 15 min at 4 $^{\circ}$ C. The samples were analyzed by Western blotting using antibodies against Cox25, Cox14, Cmc2 (protein facing the inner membrane space), and Mss51 (protein facing the matrix). *E*, sequence alignment of *S. cerevisiae* Cox25 and Cox14. *F*, Kyte-Doolittle hydrophobicity plots for these proteins. *TM* indicates a predicted transmembrane domain. *G*, topology of *S. cerevisiae* Cox25 and Cox14 in the inner membrane. Mitochondria were prepared from Δ cox25 or Δ cox14 strains, respectively, expressing Cox25 or Cox14 fused with GST at their C terminus and used for proteinase protection assays as in *D*. *H*, cartoon depicting the topology of Cox25 and Cox14 in the mitochondrial inner membrane.

ity properties. Sonic irradiation of wild-type mitochondria solubilized Cox17, a soluble protein of the intermembrane space, but not Cox25, Cox3, Cox14, or Mss51 (Fig. 4*B*).

Mss51, however, was solubilized by treatment of mitochondria with alkaline carbonate because it is a peripheral protein, whereas Cox3 was recovered in the membrane fraction, be-

cause it is an intrinsic protein of the inner membrane. Cox14 was previously shown to be associated with the inner membrane of mitochondria (30) and proposed to be a peripheral protein (6). However, similar to Cox25, Cox14 has a predicted transmembrane domain (Fig. 4E), and when reassessing its solubility properties we consistently found that both Cox14 and Cox25 were not extracted with alkaline carbonate (Fig. 4B). To discern to which membrane Cox25 is integrated, we sonicated mitochondria and separated inner and outer membranes by sucrose gradient fractionation. Porin and Cox1 were used as markers of the outer and inner mitochondrial membranes, respectively, to test the purity of the fractions. Similar to Cox1, Cox14 and Cox25 are found exclusively in the inner membrane fraction (Fig. 4C).

Similar to Mss51, a peripheral inner membrane protein facing the matrix, Cox25 has no significant hydrophilic portions located on the intermembrane space side of the inner membrane as evidenced by its resistance to proteinase K in mitochondria and in mitoplasts prepared by hypotonic swelling of mitochondria (Fig. 4D). In contrast, similar to Cmc2, a peripheral inner membrane protein facing the intermembrane space, Cox14 is protected against proteinase K degradation in mitochondria but not in mitoplasts, indicating that it must contain some hydrophilic domain exposed to the intermembrane space.

Cox25 and Cox14 are both small proteins with similar predicted structural features. An alignment of both proteins does not show a major homology beyond the predicted transmembrane domains in each one (Fig. 4E). The Kyte-Doolittle hydrophobicity plot (31) shows that both proteins contain a relatively hydrophilic C terminus (Fig. 4F). To elucidate the topology of these proteins, we prepared mitochondria from Δcox25 cells expressing functional Cox25-GST (supplemental Fig. S2) or Δcox14 cells expressing functional Cox14-GST (6) and used them in proteinase protection assays. In both cases, the GST tag was fused to the C terminus of the proteins. Cox25 and its GST tag were proteinase K protected in both mitochondria and mitoplasts, whereas Cox14 and its GST tag were protected from proteinase K digestion in mitochondria but not in mitoplasts (Fig. 4G). Taken together and as depicted in the cartoon in Fig. 4H, our results demonstrate that both Cox14 and Cox25 have a transmembrane domain and a relatively hydrophilic C-terminal domain that protrudes either into the intermembrane space (Cox14) or into the matrix (Cox25).

Cox25 Co-sediments with Mss51 in Sucrose Gradient—The similar phenotypes of Cox25 and Cox14 suggest that both proteins could cooperate with Mss51 and Ssc1 to coordinate Cox1 synthesis with its assembly into the COX holoenzyme. We have previously shown that in wild-type cells, most Mss51 is part of a 450-kDa complex (Ref. 8 and Fig. 5A) that contains Cox1, Cox14, Mss51, and Ssc1 (8). In the absence of Cox14, the 450-kDa complex is destabilized, and Mss51 accumulates in a 120-kDa heterodimer (Ref. 8 and Fig. 5A) in partnership with Ssc1 (8). Similarly, the absence of Cox25 results in the accumulation of Mss51 in the 120-kDa complex (Fig. 5A), supporting the fact that Cox25 is also part of the 450-kDa complex. This result is in agreement with the detection of

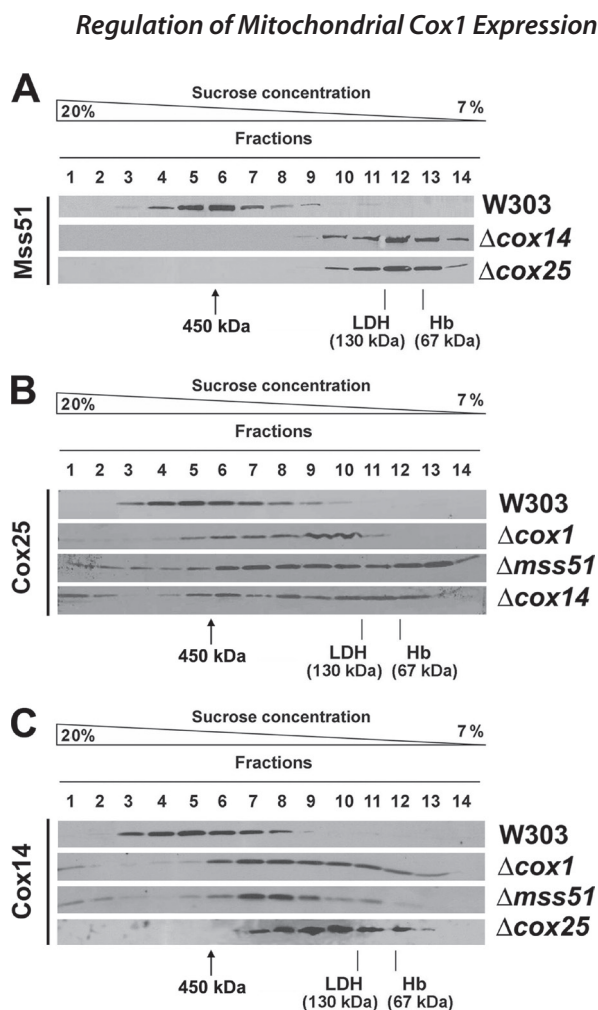


FIGURE 5. Native molecular mass and steady state levels of Cox25. A, sedimentation properties of Mss51 in a linear 7–20% sucrose gradient using mitochondrial extracts from the indicated strains. The gradient was calibrated with hemoglobin (Hb, 67 kDa) and lactate dehydrogenase (LDH, 130 kDa). The distribution of Mss51 was assayed by Western blot analysis. B and C, sedimentation properties of Cox25 (B) and of Cox14 (C) in a linear 7–20% sucrose gradient using mitochondrial extracts from the indicated strains, analyzed as in A.

Cox25 in the 450-kDa complex by mass spectrometry mentioned earlier. As expected, analyses of the sedimentation properties of Cox25 extracted from wild-type mitochondria in a sucrose gradient showed that Cox25, Cox14, and Mss51 co-sediment in the 450-kDa complex (Fig. 5). Although the absence of Cox1, Mss51, and Cox14 destabilizes this complex (Ref. 8 and Fig. 5A), both Cox25 and Cox14 remain part of the high molecular mass material (Fig. 5, B and C), presumably interacting with other COX subunits or assembly factors.

It is particularly noticeable that in the absence of Cox1, Mss51, or Cox14, a small portion of Cox25 accumulates in heavy fractions (Fig. 5B). Also Cox14 is detected in these fractions in the absence of Cox1 and Mss51 but not in the absence of Cox25 (Fig. 5C). In these fractions we have previously detected ribosomal molecules (8). The absence of Cox1, Mss51, Cox14, Cox2, and Cox5a or the large number of COX

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

assembly factors tested does not alter the steady state levels of Cox25 (supplemental Fig. S4). Unexpectedly, Cox25 levels are enhanced by ~2.5-fold in mitochondria isolated from cells devoid of mitochondrial DNA (p^0) and thus of mitochondrial ribosomes (supplemental Fig. S4). Future studies will be devoted to explore a possible association of Cox25 with mitochondrial ribosomes.

Cox25 Is Part of High Molecular Mass Complexes Containing Mss51, Cox14, Ssc1, and Newly Synthesized Cox1—Following our recently reported model of translational regulation of Cox1 synthesis, Mss51 is a component of a high molecular mass Cox1 translational complex (HMW-T), a 450-kDa Cox1 stabilization complex, and finally a 120-kDa complex containing translationally competent Mss51 (8). We have now asked whether Cox25 is physically part of these complexes.

Mss51-containing 450- and 120-kDa complexes were purified from mitochondrial extracts from a $\Delta mss51$ strain expressing *MSS51-GST* using a combination of sucrose gradients and GST pulldown as reported (8). In this strain, the steady state level of Mss51-GST is 2-fold that of Mss51 in a wild-type strain, and the excess of Mss51 accumulates in the 120-kDa complex (8). Mss51-containing HMW-T and 450- and 120-kDa complexes were similarly purified from mitochondrial extracts from a $\Delta mss51\Delta cox11$ strain expressing *MSS51-GST* as reported (8). In the later strain, in the absence of COX assembly, a significant portion of Mss51 remains trapped in the HMW-T and 450-kDa complexes, thus limiting its availability for translation (8). Using Western blot analyses, we have detected Cox25 in both the HMW-T and 450-kDa complexes but not in the 120-kDa complex as expected (Fig. 6A). The interaction among Cox25, Mss51, and Cox14 was further tested by GST pulldown assays of extracts prepared from mitochondria isolated from $\Delta cox25$ cells expressing Cox25-GST, $\Delta cox14$ cells expressing Cox14-GST, and $\Delta mss51$ cells expressing Mss51-GST, respectively. In each case, the tagged protein and the other two untagged proteins were detected by Western blot in the material adsorbed to the GST-Sepharose beads, indicating physical interactions among them (Fig. 6B).

The ability of Cox25 to interact with Cox14 and Mss51 suggested that Cox25 might be directly or indirectly interacting with newly synthesized Cox1. To test for a physical interaction with Cox1, mitochondria from a $\Delta cox25$ strain expressing Cox25-GST from a chromosomally integrated plasmid were labeled *in organello* with [35 S]methionine, extracted with 1% digitonin in the presence of 150 mM KCl and 1.2 mM $MgCl_2$ and adsorbed onto glutathione-Sepharose beads. SDS-PAGE analysis of the proteins recovered from the beads indicated quite a selective pulldown of labeled Cox1 (Fig. 6C).

Cox25 Interacts with Cox5 and Shy1—It has been recently reported that Shy1, Cox14, and Coa1 are part of large complexes and interact with Cox1-containing subassemblies downstream from the roles of Mss51 in COX biogenesis (6, 13). We have asked whether Cox25 also participates in COX assembly once Mss51 has been released from the 450-kDa Cox1 stabilization complex. Using samples from the same pulldown assays explained earlier, we have tested whether Cox25 interacts with Shy1 and the nuclear encoded subunit

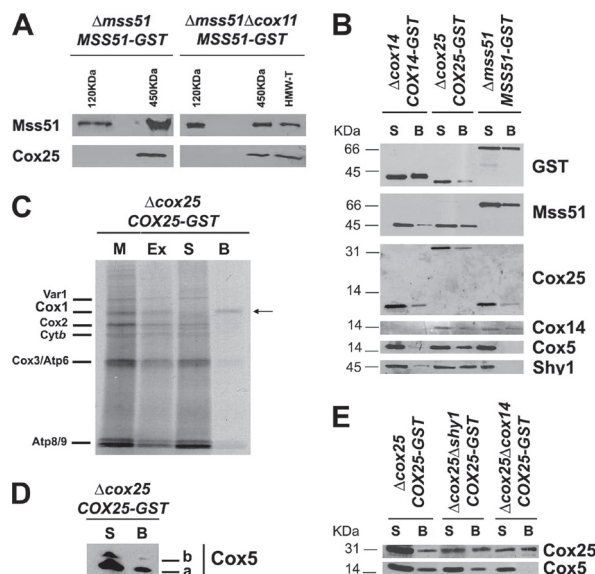


FIGURE 6. Cox25 physically interacts with Cox1 and Cox1 biogenesis and assembly factors. A, Cox25 interacts with Mss51 in the 450-kDa complex and in the high molecular mass Cox1 translational complex (HMW-T) but not in the 120-kDa complex previously described (8). Complexes containing Mss51 were purified by sucrose gradient followed by GST pulldown of mitochondrial extracts from either a $\Delta mss51$ or a $\Delta mss51\Delta cox11$ both expressing a GST-tagged version of Mss51 (8). Samples from the different complexes were analyzed by Western blotting using antibodies against Mss51 and Cox25. B, mitochondria were prepared from $\Delta mss51$ cells expressing Mss51-GST, $\Delta cox14$ cells expressing Cox14-GST and $\Delta cox25$ cells expressing Cox25-GST, extracted with 1% digitonin, 150 mM KCl, and 1.2 mM $MgCl_2$ in buffer containing 20 mM HEPES and 0.5 mM PMSF and used for GST pulldown assays. Samples of material bound to GST-Sepharose beads (lanes B) or remaining in the supernatant (lanes S) were separated in a 12% Tris-glycine SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using specific antibodies against the indicated proteins. C, interaction of Cox25 with newly synthesized Cox1. Mitochondria isolated from a $\Delta cox25$ strain with a chromosomally integrated plasmid expressing Cox25-GST fusion protein were labeled with [35 S]methionine for 30 min, extracted, and submitted to GST pulldown as described under "Experimental Procedures." Mitochondria (M) corresponding to 20 μ g of protein, equivalent volumes of the extract (Ex), the supernatant from the glutathione-Sepharose beads (S), and the washed beads (B) were separated on a 17.5% polyacrylamide gel by SDS-PAGE. D, Cox25-GST pulldown samples were also separated in a 16.5% Tris-Tricine SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-Cox5 antibody. E, GST pulldown analyses performed as in C, using mitochondrial extracts from $\Delta cox25$, $\Delta cox25\Delta cox14$, and $\Delta cox25\Delta shy1$ cells all expressing COX25-GST. Material unbound (S) or bound to the GST-Sepharose beads was analyzed by Western blotting using antibodies against Cox25 and Cox5.

Cox5, probably the first subunit to form an assembly intermediate with Cox1 (14). Although Mss51-GST does not pull down Shy1 nor Cox5, these proteins are poorly co-precipitated with Cox14-GST and very efficiently with Cox25-GST (Fig. 6B). Noticeably, both Cox5 isoforms were co-precipitated with Cox25-GST (Fig. 6D). Furthermore, we tested whether the interaction of Cox25 with Cox5 depends on Shy1 and Cox14. For that purpose, we prepared $\Delta cox25$ strains expressing COX25-GST from a chromosomally integrated plasmid and carrying an additional mutation either in *shy1* or in *cox14*. Mitochondrial extracts from these strains were used for pulldown assays. As shown in Fig. 6E, Cox5 was efficiently pulled down in the absence of Shy1, but only traces were detected in the absence of Cox14 when the film was overexposed (data not shown). In all the GST pulldown assays, none

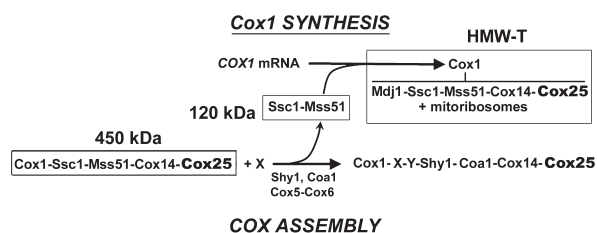


FIGURE 7. Scheme of a model depicting the role of Ssc1 and Cox14 on translational regulation of cytochrome c oxidase biogenesis by interacting with Mss51 in several high molecular mass complexes. Cox25 is a partner in some of these complexes. See the explanation in the text.

of the analyzed proteins were detected bound to plain (non-GST conjugated) Sepharose beads (data not shown). Our results indicate that in addition to interacting with Mss51, Cox14 and Cox25 also exist as part of large COX assembly intermediates not necessarily involving Shy1.

DISCUSSION

Our findings identify Cox25 as a new essential COX biogenesis factor. It is required to promote the stability of newly synthesized Cox1 and, in this capacity, to facilitate regulation of *COX1* mRNA translation and couple this process to Cox1 assembly into multi-subunit intermediates.

In most COX assembly mutants, the rate of Cox1 synthesis is significantly lower than in wild-type cells. Experimentally, *COX1* mRNA translational auto-regulation can be bypassed in the absence of COX assembly by increasing the effective concentration of Mss51 as a *COX1* mRNA translational activator, thus preventing the trap of Mss51 with newly synthesized Cox1 in high molecular mass complexes. This can be accomplished in a COX mutant strain by introducing an additional copy of *MSS51* or by substituting the endogenous *MSS51* by certain mutant *mss51*^{F199I} and *mss51*^{T167R} alleles that encode Mss51 proteins with an increased ability to be released from the 450-kDa Mss51-trapping complex (6, 8). An alternative approach consists of destabilizing the Mss51-trapping complex by introducing mutations in either *coa1* (13, 15) or *cox14* (6). This later approach allowed us to identify Cox14 as a protein involved in Cox1 translational auto-regulation. Now we have identified Cox25 as part of the Cox1 translational complex and the 450-kDa Cox1 preassembly complex, and in this capacity, the absence of Cox25 destabilizes these complexes, increasing the availability of Mss51 for *COX1* mRNA translation in the absence of COX assembly.

Following our recently reported model of translational regulation of Cox1 synthesis (8), depicted in Fig. 7, in wild-type cells, a small portion of total Mss51 is present in a binary 120-kDa complex with Ssc1. When required for COX assembly, Mss51 molecules contained in this pool would interact with the 5'-UTR of the *COX1* mRNA to promote its translation (4, 7). During Cox1 synthesis, Mss51 would interact directly or indirectly with the mitochondrial ribosomes and with the nascent Cox1 polypeptide together with the chaperones Ssc1 and Mdj1, which would ensure the proper folding of the nascent polypeptide. Cox14 and Cox25 are imagined to be added to this complex at a later step, forming a HMW-T. Once Cox1

synthesis is completed, Cox14 and Cox25 serve to stabilize a 450-kDa Ssc1-Mss51-Cox1-Cox14-Cox25 complex. The release of Mss51 from this complex is possibly catalyzed by the incorporation of the COX assembly factors Shy1 and Coa1 as well as nuclear encoded subunits Cox5a-Cox6, thus allowing Cox1 to proceed to downstream events in the COX assembly process (4–6, 13, 15). In this way, Mss51 becomes available for new rounds of translation (Ref. 8 and Fig. 7).

Noticeably, Cox25 and Cox14 are relatively similar proteins that seem to perform quite similar roles. However, their functions are essential for COX assembly and nonoverlapping because overexpression of *COX25* in a Δ *cox14* mutant or of *COX14* in a Δ *cox25* mutant does not suppress the COX assembly and respiratory growth defects of these strains. Both Cox25 and Cox14 have a similar predicted architecture, although their orientation in the inner membrane is different. Both have a transmembrane domain and a hydrophilic C terminus, but the latter protrudes into a different mitochondrial compartment for each protein. Although the C terminus of Cox14 resides in the intermembrane space and is glutamine-rich, the C terminus of Cox25 resides in the matrix milieu and contains a positively charged lysine-rich terminal domain. Because Cox25 is found in Cox1 translational complexes, it is tempting to speculate that Cox25 could mediate the interaction of Mss51 with the mitoribosome. Incidentally, we have noticed that ORF YJL062W-A containing *COX25* is located in chromosome X “head to head” to ORF YJL063C containing *MRPL8*, which encodes a mitoribosomal protein of the large subunit. The proximity of these genes (less than 250 bp apart) suggests that their expression could be co-regulated. The topologies of Cox14 and Cox25 appear to be suitable to promote the stability of the Cox1-Mss51-Ssc1 complex by interacting with Cox1 through their transmembrane domains and holding the complex from both the intermembrane space and the matrix sides of the inner membrane.

A phenotypic trait that distinguishes Δ *cox25* and Δ *cox14* mitochondria is the different steady state level of Cox5. In the absence of Cox25, Cox5 accumulation is significantly lowered, suggesting a role for Cox25 in the stability of this subunit. COX assembly is thought to be a sequential process (32, 33) initiated by the synthesis of Cox1, which subsequently forms a subassembly with Cox5 and Cox6 (33, 34). These subunits are in direct contact with Cox1 in the mature enzyme (35). Cox5 interacts with Cox1 through its single transmembrane domain, whereas Cox6 caps the matrix side of Cox1 (35). It was previously reported that during the COX assembly process, upon release of Mss51 from the Cox1 preassembly complex, Cox14 still interacts with Cox1 and becomes part of higher order subassemblies involving Coa1, Shy1, and Cox5 (13, 15). Here we have shown that Cox25 also participates in these later assembly steps by interacting with Shy1 and Cox5. We were able to pull down Cox5 together with Cox25-GST with efficiency significantly higher than with Cox14-GST. It is tempting to speculate that Cox25 could directly interact with Cox5, thus providing stability to this protein in the absence of COX assembly. Additionally, the Cox25-Cox5 interaction requires Cox14. This could suggest that Cox25 does not exist in a complex with Cox5 prior to its role in Cox1 biogenesis.

Regulation of Mitochondrial Cox1 Expression

Contrarily, the interaction of Cox25 with Cox5 does not depend on Shy1, which suggests that Shy1 could interact with the Cox1 subassemblies concurrently or immediately after incorporation of subunit Cox5. Further studies are required to elucidate essential aspects of the COX biogenesis process involving the incorporation of Cox2 into the assembly intermediates and the precise timing for the maturation of both Cox1 and Cox2 by incorporation of their metal prosthetic groups.

In summary, in this work we have described Cox25, a protein partner of Cox14, Mss51, and Ssc1, essential for COX assembly-dependent translational autoregulation of Cox1 synthesis. Our observations fit in a model in which Cox25 additionally participates in assembly steps beyond Cox1 biogenesis serving to promote the incorporation or stability of Cox5 within COX assembly intermediates. We conclude that Cox25 and Cox14 in cooperation coordinate the regulation of Cox1 synthesis and its assembly with partner subunits, thus facilitating the assembly of the COX holoenzyme.

Acknowledgments—We thank Dr. M. Bourens, Dr. C. Trivigno, and I. C. Soto for critically reading the manuscript. We are in debt to Dr. Alexander Tzagoloff (Columbia University, New York) for providing an antibody against Cox17.

Note Added in Proof—During the review process of our manuscript, it has come to our attention that a paper has been published in *J. Cell. Biol.* (47) presenting the identification of the gene encoded in open reading frame YJL062W-A, which we have called COX25, and which was called COA3 in that paper. COA3 is the standard name assigned in the SGD site. Both papers conclude that the protein encoded in this gene is involved in translational regulation of COX1 in mitochondria from *S. cerevisiae*.

REFERENCES

- Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2006) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, C1129–C1147
- Fontanesi, F., Soto, I. C., and Barrientos, A. (2008) *IUBMB Life* **60**, 557–568
- Langer, T., Käser, M., Klanner, C., and Leonhard, K. (2001) *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 431–436
- Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003) *EMBO J.* **22**, 5951–5961
- Barrientos, A., Korr, D., and Tzagoloff, A. (2002) *EMBO J.* **21**, 43–52
- Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004) *EMBO J.* **23**, 3472–3482
- Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R. L., Fox, T. D., Tzagoloff, A., and Barrientos, A. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 523–535
- Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2010) *Mol. Cell. Biol.* **30**, 245–259
- Shingú-Vázquez, M., Camacho-Villasana, Y., Sandoval-Romero, L., Butler, C. A., Fox, T. D., and Pérez-Martínez, X. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 34382–34389
- Wollman, F. A., Minai, L., and Nechushtai, R. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 21–85
- Choquet, Y., Wostrickoff, K., Rimbault, B., Zito, F., Girard-Bascou, J., Drapier, D., and Wollman, F. A. (2001) *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 421–426
- Wostrickoff, K., and Stern, D. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 6466–6471
- Mick, D. U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A. E., Perschil, L., Pawlas, M., Meyer, H. E., Warscheid, B., and Rehling, P. (2007) *EMBO J.* **26**, 4347–4358
- Fontanesi, F., Jin, C., Tzagoloff, A., and Barrientos, A. (2008) *Hum. Mol. Genet.* **17**, 775–788
- Pierrel, F., Bestwick, M. L., Cobine, P. A., Khalimonchuk, O., Cricco, J. A., and Winge, D. R. (2007) *EMBO J.* **26**, 4335–4346
- Khalimonchuk, O., Bestwick, M., Meunier, B., Watts, T. C., and Winge, D. R. (2010) *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1004–1017
- Myers, A. M., Pape, L. K., and Tzagoloff, A. (1985) *EMBO J.* **4**, 2087–2092
- Faye, G., Kujawa, C., and Fukuhara, H. (1974) *J. Mol. Biol.* **88**, 185–203
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Valledor, M., Horn, D., Singh, R., and Barrientos, A. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1776–1786
- Tzagoloff, A., Akai, A., and Needleman, R. B. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 8228–8235
- Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Craig, E. A., and Neupert, W. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 893–902
- Martin, R. G., and Ames, B. N. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 1372–1379
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J., and Tzagoloff, A. (1986) *Yeast* **2**, 163–167
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schiestl, R. H., and Gietz, R. D. (1989) *Curr. Genet.* **16**, 339–346
- Rothstein, R. J. (1983) *Methods Enzymol.* **101**, 202–211
- Merz, S., and Westermann, B. (2009) *Genome Biol.* **10**, R95
- Horn, D., Zhou, W., Trevisson, E., Al-Ali, H., Harris, T. K., Salviati, L., and Barrientos, A. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 15088–15099
- Glerum, D. M., Koerner, T. J., and Tzagoloff, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15585–15590
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132
- Nijtmans, L. G., Taanman, J. W., Muijsers, A. O., Speijer, D., and Van den Bogert, C. (1998) *Eur. J. Biochem.* **254**, 389–394
- Williams, S. L., Valnot, I., Rustin, P., and Taanman, J. W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 7462–7469
- Church, C., Goehring, B., Forsha, D., Wazny, P., and Poyton, R. O. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 1854–1863
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136–1144
- Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R. B., and Zulch, G. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 8236–8242
- Manthey, G. M., Przybyla-Zawislak, B. D., and McEwen, J. E. (1998) *Eur. J. Biochem.* **255**, 156–161
- Glerum, D. M., and Tzagoloff, A. (1997) *FEBS Lett.* **412**, 410–414
- Barros, M. H., and Tzagoloff, A. (2002) *FEBS Lett.* **516**, 119–123
- Nobrega, M. P., Nobrega, F. G., and Tzagoloff, A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14220–14226
- Glerum, D. M., Muroff, I., Jin, C., and Tzagoloff, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19088–19094
- Tzagoloff, A., Capitanio, N., Nobrega, M. P., and Gatti, D. (1990) *EMBO J.* **9**, 2759–2764
- Glerum, D. M., Shtanko, A., and Tzagoloff, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 14504–14509
- Glerum, D. M., Shtanko, A., and Tzagoloff, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20531–20535
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., and Stuart, R. A. (1997) *FEBS Lett.* **418**, 367–370
- Carlson, C. G., Barrientos, A., Tzagoloff, A., and Glerum, D. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3770–3775
- Mick, D. U., Vukotic, M., Piechura, H., Meyer, H. E., Warscheid, B., Deckers, M., and Rehling, P. (2010) *J. Cell Biol.* **191**, 141–154

CCDC56 is a novel mitochondrial protein essential for cytochrome c oxidase function*

Susana Peralta^{1,3}, Paula Clemente¹, Álvaro Sánchez-Martínez^{1,4}, Manuel Calleja⁵, Rosana Hernández-Sierra¹, Yuichi Matsushima^{6,7}, Cristina Adán¹, Cristina Ugalde², Miguel Ángel Fernández-Moreno¹, Laurie S. Kaguni⁶ and Rafael Garesse^{1,2}.

- 1- Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAM-CSIC. Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.
- 2- Instituto de Investigación Sanitaria 12 de Octubre (i+12) Madrid, Spain.
- 3- Present address: Department of Neurology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida 33136, USA.
- 4- Present address: Department of Biomedical Sciences, MRC Centre for Developmental and Biomedical Genetics, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK.
- 5- Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” CSIC-UAM, Madrid, Spain.
- 6- Department of Biochemistry and Molecular Biology, and Center for Mitochondrial Science and Medicine, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1319, USA.
- 7- Present address: Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

Running Title: Isolated COX deficiency in *Drosophila*

* Corresponding author. Rafael Garesse, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAM-CSIC. c/ Arturo Duperier 4, 28029-Madrid, Spain. Email: rafael.garesse@uam.es Phone +34-914975452. Fax: +34-91-5854401

Accession codes. GenBank: CCDC56, NP_001035521.1. Flybase ID: FBgn0261353, CG42630.

Keywords: CCDC56, cytochrome *c* oxidase, OXPHOS function, Complex IV, mitochondria, *Drosophila*

CAPSULE

Background: Cytochrome *c* oxidase (COX), the final enzyme of the mitochondrial electron transport chain, requires several assembly factors for its proper function.

Results: *ccdc56*-Knock-out flies showed developmental delay, lethality and a dramatic decrease in the levels/ activity of COX.

Conclusion: CCDC56 protein is necessary for COX function and for viability in flies.

Significance: *Drosophila*-CCDC56 is a novel putative COX assembly factor conserved in humans.

SUMMARY

In *Drosophila melanogaster*, the mitochondrial transcription factor B1 (*mtTFB1*) transcript contains in its 5'-UTR a conserved upstream Open Reading Frame (uORF) denoted as CG42630 in FlyBase.

We demonstrate that CG42630 encodes a novel protein: the Coiled-Coil Domain Containing protein 56, CCDC56, conserved in metazoans. We show that *Drosophila* CCDC56 protein localizes to mitochondria and contains 87 amino acids in flies and 106 in humans, with the two proteins sharing 42% amino acid identity. We show by RACE and Northern-blotting that *Drosophila* CCDC56 protein and *mtTFB1* are encoded on a *bona fide* bicistronic transcript. We report the generation and characterization of two *ccdc56* knockout lines in *Drosophila* carrying the *ccdc56*^{D6} and *ccdc56*^{D11} alleles. Lack of the CCDC56 protein in flies induces a developmental delay and 100% lethality by arrest of larval development at the third instar. *ccdc56* knockout larvae show a significant decrease in the level of fully-assembled cytochrome *c* oxidase (COX) and in its activity, suggesting a defect in complex assembly; the activity of

the other OXPHOS complexes remained either unaffected or increased in the *ccdc56* knockout larvae. The lethal phenotype and the decrease in COX were rescued partially by reintroduction of a wild-type *UAS-CCDC56* transgene. These results indicate an important role for CCDC56 in the OXPHOS system and in particular in COX function, required for proper development in *Drosophila melanogaster*. We propose CCDC56 as a candidate factor required for COX biogenesis/ assembly.

INTRODUCTION

Cytochrome *c* oxidase (COX) or Complex IV (EC 1.3.9.1) is the terminal enzyme of the electron transport chain, and catalyzes electron transfer from reduced cytochrome *c* to molecular oxygen. Most cellular ATP is produced in mitochondria by the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system comprising the electron transport chain complexes (plus two electron carriers, coenzyme Q and cytochrome *c*) and the multimeric ATP-synthase (complex V) (1). The energy released from the oxidation of carbohydrates and lipids is converted to reducing power (NADH + H⁺ and FADH₂) in the mitochondrial matrix. The electron transport chain couples electron transfer from NADH and FADH₂ to molecular oxygen, with the proton translocation from the matrix to the mitochondrial intermembrane space by complexes I, III and IV. This proton translocation generates an electrochemical gradient that is used by complex V to generate ATP from ADP and inorganic phosphate.

Defects in the OXPHOS system are associated with human mitochondrial diseases that are characterized by a wide variety of symptoms and affected organs (2,3), with an incidence of at least 1 in 5000 live births (4,5). COX deficiency is one of the most common respiratory chain defects in human pathology and it has been associated with a wide variety of clinical phenotypes (6,7). Eukaryotic COX is a heteromeric enzyme of dual genetic origin (8,9). The catalytic core of the enzyme is composed of three subunits encoded in the mitochondrial DNA (mtDNA): mt-CO1, mt-CO2 and mt-CO3. The structural subunits that surround the catalytic core are encoded by the nuclear genome (nDNA)(10). The nDNA-encoded subunits must be imported into the

mitochondria, processed and assembled together with the mtDNA-encoded subunits to form the holoenzyme. The nDNA-encoded subunits are necessary for the assembly/ stability of the holoenzyme (11), and to regulate the catalytic activity of complex IV (12,13).

The majority of COX deficiencies in humans have been associated with mutations in COX assembly factors (reviewed in 7), although some rare diseases have been associated with mutations in COX structural subunits (2,14). For this reason the biogenesis of cytochrome *c* oxidase has garnered much interest in the last few years. More than 20 assembly factors required for correct COX function have been described in yeast, albeit the specific function of many of these factors remains elusive (reviewed in 15). Assembly factors are proteins involved in the biogenesis of the complex, which are not present in the mature complex. They are involved in different biological processes, for example in the biogenesis and/ or insertion of prosthetic groups (16-19), regulation of mt-CO1 translation (20), and stabilization of the mt-CO1 and mt-CO3 transcripts (21,22).

Transcription of genes in bacteria and Archaea occurs in polycistronic messenger RNA, whereas in Eukaryota the majority of genes are transcribed monocistronically (23). However, there are some exceptions in Eukaryota where genes are transcribed in polycistronic messages and in general, these polycistronic genes tend to be involved in the same biological process as occur in bacteria (24-27).

Mitochondrial gene expression is regulated by several nuclear encoded proteins, including the mitochondrial transcription factor B1 (mtTFB1) (28). mtTFB1 is dual-function protein that can activate mtDNA transcription *in vitro* (29) and act as rRNA methyltransferase *in vivo* (30,31). Previous work from our group in cultured *Drosophila* cells indicated a major role for mtTFB1 in mitochondrial translation (32). And more recently, Larsson and coworkers have corroborated this data in mammals, where they showed methylation of the 12S rRNA mediated by mtTFB1 is required for assembly of the mitochondrial ribosome, and therefore for mitochondrial translation (33). The *mtTFB1* gene in *Drosophila melanogaster* was annotated as the protein coding gene number

CG7319 in the fly genome database (<http://flybase.org>). More recently, the FlyBase Genome Annotators have published changes affecting the annotation of the *mtTFB1* gene that indicates the existence of an upstream Open Reading Frame (uORF) in its 5'-untranslated region. The putative protein coding gene is annotated as *CG42630* in the flybase database (<http://flybase.org>). Here we show that *CG42630* is transcribed in a bicistronic RNA messenger with the *mtTFB1* gene and is expressed in flies. Blast of the novel uORF indicated 42% amino acid identity with the human annotated Coiled-Coil Domain Containing protein 56, (CCDC56; NP_001035521.1). Thus, we propose *Drosophila CG42630* as the homologue of human CCDC56. Although the function of CCDC56 is unknown, it is highly conserved in higher eukaryotes. To study the function of the CCDC56 protein, we generated a *Drosophila melanogaster* knockout model by inducing genomic deletions by imprecise P-element excision. Our results indicate that the CCDC56 homolog is a mitochondrial protein required for COX activity and assembly in *Drosophila melanogaster*, suggesting a role as a COX assembly factor.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Drosophila strains and genetics

All fly crosses and stocks were grown at 25°C on a standard *Drosophila* medium. *ccdc56^{D6}* and *ccdc56^{D11}* mutants were generated by inducing the transposition of the SUPor-P[kg07792] P element insertion using standard procedures (34) as represented in FigS1. Deletion breakpoints of alleles were determined by PCR followed by sequencing using specific primers (Fig 3B-C, Table S2). Sequences were assembled and analyzed using the Vector NTI software (Invitrogen). Transgenic lines for the *pUASP-CCDC56*, *pUASP-mtTFB1* and *pUASP-cDNAbi* constructs were generated by the injection of *Drosophila* embryos (BestGene). For more details, see Table S1.

Identification and sequence analysis of bicistronic *ccdc56-mtTFB1* cDNA and CCDC56

cDNAs from *Drosophila* control larvae (*w¹¹¹⁸* and *Oregon R-C*) and Schneider cells were

prepared using the *First Choice RLM-RACE* cDNA amplification kit (Ambion). 5' RACE was performed using the following specific primers for *Drosophila mtTFB1* cDNA (*CG42631*, formerly *CG7319*): R1, R2 and R3, depicted in Fig1A. These primers, plus primers F1 and F2 used for 3' RACE are described in Table S2. RACE products were cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced. Sequence analysis was performed using Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Software). Human CCDC56 (NP_001035521.1) and CCDC56 homologues were identified by BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) using the deduced amino acid sequence of the *D. melanogaster CG2630* coding gene (35). Multiple sequence alignments of the predicted CCDC56 polypeptides were performed using the ClustalW 2.0.12 algorithm (36).

Northern blotting

Five µg of total RNA from control flies were resolved on a 1.2% agarose gel and transferred to a ZETA-PROBE GT membrane (Bio-Rad) following standard procedures. Invitrogen's 0.5 – 10 Kb RNA Ladder was used as a molecular size marker. A PCR fragment of 280 bp containing the complete *ccdc56* ORF (261 bp) was used as a *ccdc56*-specific probe. This probe was amplified by PCR from the pUASP-CCDC56 construct using primers 9558F and 9559R (see below). The specific probe for the *mtTFB1* coding sequence (322 bp) was obtained by PCR amplification using the primers F9: 5'-AGCACATCCCGGACACCTCA-3' and R4: 5'-TTTAGGGGAATTAGCTTGACG-3'. Probes were radiolabeled with [³²P]-dCTP using the Amersham Rediprime II Random Prime Labeling System (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions.

Phenotyping analysis

We carried out 2-hour egg lays from the control *w¹¹¹⁸* stock and the stable mutant stocks *ccdc56^{D6}/TM6b-Tb* and *ccdc56^{D11}/TM6b-Tb*. To determine if mutant larvae were developmentally arrested, developmentally delayed, or merely slow growing, their mouth hooks were examined daily under the microscope from the fifth day after egg laying (AEL). Fly vials were also photographed daily.

Bacterial expression of d-CCDC56 and generation of anti d-CCDC56 antibody

To express *d-CCDC56* in *Escherichia coli*, a PCR fragment encoding the *d-CCDC56* open reading frame was cloned into the pRSET-B vector (Invitrogen) cut with *NcoI* and *HindIII*. Primers used were: Fw: 5'-TTCCATGGCGGCGTCGGAGCAGGGACC-3' and Rv: 5'-AGAAGCTTCTAGGAAGACACCTTCTTGGGCTC-3'. Polyclonal antibody was generated using standard procedures.

Constructs for the generation of transgenic flies

The bicistronic *ccdc56-mtTFB1* cDNA (1574 bp) was obtained from the cDNA clone LD40326 (GenBank AY069635) and cloned into the *BglIII/XbaI* restriction sites of the pUAST transformation vector to generate the pUAST-*cDNA-bi* construct. To generate the pUASP-*ccdc56* vector for transformation, a fragment containing exclusively the complete *ccdc56* ORF (261 bp), was amplified by PCR using the following primers: 9558F: 5'-TTTAGCAGCGTTTATAATGTCG-3' and 9559R: 5'-TAGGGATAACTAACGCGGACA-3', subcloned into the pCAP vector (Roche) and cloned into the *NotI/XbaI* restriction sites in the pUASP vector. To generate the pUASP-*mtTFB1* construct, *mtTFB1* ORF (990 bp) was obtained by digestion with *KpnI/NotI* of the pBluescript II KS+ vector (Stratagene) containing the *mtTFB1* cDNA and cloned into the pUASP vector for transformation.

Drosophila CCDC56-FLAG construct

D. melanogaster CCDC56 ORF was amplified by PCR from the pUASP-*ccdc56* construct indicated above, using the following primers: F 5'-TTGGTACCATGTGCGGCGTCGGAGCAGGACC-3' and R 5'-TTGCGGCCCGCCTACTTGTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGGAAGACACCTTCTTGGGCTCC-3' containing the FLAG epitope at the C-terminal and the *KpnI/NotI* sites needed for cloning into the mammalian expression vector pcDNA3 (Invitrogen). Fidelity of the clones was confirmed by sequencing.

Transfection and generation of CCDC56-FLAG overexpressing cell lines

Human HeLa cells were grown in DMEM (GIBCO-BRL) supplemented with 5% fetal bovine serum (GIBCO-BRL). 1.5×10^5 HeLa cells were plated on coverslips and transfected with 2 µg of the pcDNA3-*d-ccdc56*-FLAG construct. Lipofectamine (Invitrogen) was used as a transfection reagent, following the manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry

To label the mitochondrial compartment, cells were incubated for 30 min with 250 nM of the mitochondrial dye MitoTracker red (Invitrogen) 24 h after transfection, washed, and fixed for 15 min in 2% paraformaldehyde. Primary anti-FLAG antibody (1:1000, Stratagene) and secondary Alexa Fluor 488 anti-mouse antibody (1:200, Molecular Probes) were used. Images were collected using a Confocal microscope (Leica).

Imaginal discs from third instar larvae of each genotype were dissected in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. They were blocked in PBS, 1% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100 for 1 h, incubated with the primary antibody overnight at 4°C (dilution 1:50), washed, and incubated with the appropriate secondary antibody for 2 h at room temperature in the dark (dilution 1:200). Finally, they were washed and mounted in Vectashield (Vector Laboratories). Primary antibodies used were rabbit anti-phosphohistone 3 (Sigma-Aldrich) and rabbit anti-caspase 3 (Cell Signaling Technology). Secondary antibodies were coupled to the fluorochromes Alexa Fluor 647 (Invitrogen) or Alexa 555 (Invitrogen). Preparations were visualized under a Leica TCS SP2 laser-scanning microscope.

Mitochondrial enzyme assays and mtRNA and mtDNA quantification

For enzymatic activity measurements, mitochondria-enriched homogenates were prepared from approximately 30 third instar larvae ground in SETH buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 100 U/L heparin, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4), fractionated by differential centrifugation and sonicated (6s, 15 microns at 4°C). The activities of the respiratory chain complexes I, II, III and IV and the mitochondrial mass marker citrate synthase were measured by spectrophotometric methods as previously described (37) and expressed in nanomoles of

substrate catalyzed per minute per milligram of protein. For mtRNA quantification, RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) and 1 µg from each genotype was converted into cDNA and amplified in a 7900 *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) using the Taqman probes listed in Table S3. For relative quantification of mtDNA, genomic DNA was isolated from third instar larvae and quantified using standard methods. Ten ng of each DNA were used as template. Taqman probes for *mt-ND5* and *mt-CO1* were used (Table S3).

Immunoblotting/ subcellular fractionation

Thirty µg of each mitochondrial protein extract, obtained by differential centrifugation, were separated on 10% or 15% SDS-PAGE gels and transferred to Immobilon P PVDF membranes (Millipore). Filters were pre-incubated for 1 h in 5% skim milk in TBS-0.1% Tween 20, followed by an overnight incubation with the corresponding primary antibody. Monoclonal antibody against Porin (1:2000, VDAC) was obtained from Molecular Probes, polyclonal antibody against d-CCDC56 was generated as described above (1:50), and polyclonal antibody anti-mtTFB1 was previously generated by Dr. L. Kaguni (1:1000, (32)). For subcellular fractionation, *Drosophila melanogaster* embryos were homogenized in 250 mM sucrose, 10 mM TES and 1mM EDTA pH 7.4 with 5 strokes at 1000 rpm using a motor-driven Teflon pestle. Homogenates were then centrifuged at 900g for 10 minutes at 4°C and the supernatant was centrifuged again at 9000g for 10 minutes at 4°C to obtain the mitochondrial fraction (pellet) and post-mitochondrial supernatant. Fifty µg of each fraction were loaded onto 12% SDS-PAGE gels, transferred to PVDF membranes and probed with anti- Porin (1:1000), anti-GAPDH (1:1000, Stressgene) and anti-d-CCDC56 (1:50) antibodies.

Blue native gel analyses

Mitochondrial pellets isolated from larvae were resuspended in 1.5 M aminocaproic acid, 75 mM Bis-Tris (pH 7.0). Respiratory chain complexes were extracted with 2% laurylmaltoside for 20 min on ice, and then centrifuged for 30 min at 4°C. Blue Native Polyacrilamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) and 2D electrophoresis (2D SDS-

PAGE) were performed as described (38), loading 40 µg of mitochondrial protein per lane. A 4-18% native acrylamide gradient gel was used for the first dimension and 10% acrylamide gels were used for electrophoresis in the second dimension. Proteins were transferred overnight to a nitrocellulose membrane. Anti mt-CO3 (Invitrogen) was used at a 1:200 dilution; polyclonal antibody against β-ATPase, generated in our lab (39) was used at 1:1000, and secondary goat-anti mouse antibody IgG-HRP (provided by Zymed Laboratories) was used at 1:2000.

In-gel activity assays (IGAs) for Complex I and IV were performed as described in (38) using 60 µg of mitochondrial protein per lane.

Statistical analysis

Statistical data analysis was performed with Prism 4.03 software (GraphPad Software). One-way ANOVA (plus Bonferroni post-test) and Student's t-test were used to determine statistical significance of the results, which was assumed at $p < 0.05$.

RESULTS

The *D. melanogaster* gene *CG42630* is expressed in a bicistronic mRNA with *mtTFB1* and encodes a novel conserved protein, CCDC56.

A search in the *Drosophila* genome database (<http://flybase.org>) indicated the existence of an upstream Open Reading Frame (uORF) in the 5'-UTR of the *mtTFB1* transcript located in the first exon of the mRNA (Fig1A). This putative polypeptide is denoted as *CG42630* in FlyBase, and the biological processes in which it is potentially involved are unknown. To confirm the existence of a *bona fide* bicistronic transcript of *CG42630-mtTFB1*, we isolated mRNA from *Drosophila* strains and from *Drosophila* SL2 Schneider cells, and carried out Rapid Amplification of cDNAs ends (RACE, Fig1B), using the strategy described in Materials and Methods. We sequenced the cDNA clones obtained by 5'-RACE from different *Drosophila* strains (*w¹¹¹⁸*, n=8; *Oregon R-C*, n=6) and from cultured Schneider cells (n=6), and in all cases sequence analyses detected a single transcript with a heterogeneous transcription start point located upstream from the *CG42630* uORF (Fig1B). We excluded the

presence of transcripts coding only for *CG42630* by 3'-RACE (data not shown). These results suggest strongly that *d-mtTFB1* and the putative gene, *CG42630*, are transcribed in the same mRNA, and therefore are encoded in a bicistron. We tested the existence of this *CG42630-mtTFB1* bicistronic mRNA by Northern blot in total RNA extracted from *D. melanogaster* flies (Fig1C) using two different probes: a 280 nucleotide (nt) probe specific for the *CG42630* coding sequence, and a 320 nt probe specific for the *mtTFB1* coding sequence (see Materials and Methods). We detected with both probes a single signal of about the expected size of 1574 bp (Figure 1A), confirming the existence of the *CG42630-mtTFB1* bicistronic structure in *D. melanogaster*.

The putative *CG42630* gene encodes a predicted polypeptide of 87 amino acids (<http://flybase.org>). The deduced amino acid sequence from *Drosophila CG42630* was used to perform a BLAST analysis of the human genome (35), and a single protein of unknown function was identified: the Coiled-Coil Domain Containing protein 56, CCDC56. We found a 42% amino acid identity between *D. melanogaster* and its human homolog. CCDC56 has two putative domains: a single-pass transmembrane domain (aa58 to aa78 in humans and aa49 to aa69 in *D. melanogaster*) and a protein-protein interaction coiled-coil domain (from aa79 to aa104 in humans and from aa70 to aa 87 in *D. melanogaster*) (Fig1E). We refer to the *Drosophila CG42631* gene as *ccdc56*.

In contrast to the bicistronic structure detected in flies, human CCDC56 is encoded in a single transcript and the gene is located on chromosome 17q.21.31 (Entrez gene ID 28958). Human CCDC56 protein contains 106 aa protein (Swiss Prot Q9Y2R0). Orthologous CCDC56 proteins are present in metazoans showing a high degree of conservation (Fig1D), but they are absent in yeast and plants. No mitochondrial signal peptide was detected in the amino acid sequences of the *Drosophila* and human CCDC56 proteins using the bioinformatic programs TargetP and iPSORT.

CCDC56 is a mitochondrial protein.

In prokaryotes, operons encode factors that are usually involved in the same metabolic

pathway or biological process (40). Because mtTFB1 is an essential protein involved in mitochondrial translation, we first examined the possibility that CCDC56 is also located in mitochondria (32,33). We cloned the *Drosophila* CCDC56 ORF tagged with the Flag epitope (FLAG) at the carboxyterminal end (*d-CCDC56-FLAG*), and transiently-transfected cultured HeLa cells (Fig2). Using anti-FLAG antibodies, we observed a clear colocalization with the mitochondrial-specific dye MitoTracker Red, indicating that the tagged CCDC56 version has a mitochondrial localization (Fig2C).

In order to detect the endogenous protein in the fly, we generated a polyclonal antibody against the *Drosophila* CCDC56 polypeptide. Immunoblot analysis of subcellular fractions of wild type embryos demonstrated that endogenous *Drosophila* CCDC56 (*d-CCDC56*) is expressed and localized to the mitochondrial fraction (Fig2D). The protein shows an electrophoretic mobility that corresponds to a molecular mass of approximately 10 KDa, in accordance with the predicted size of the *Drosophila* CCDC56 protein. Monoclonal anti-porin antibody was used as a mitochondrial marker.

Generation of *ccdc56* knockout alleles

To study the *in vivo* function of CCDC56 we generated transgenic flies harbouring *ccdc56* loss-of-function alleles. To generate deletions that affect specifically the *ccdc56* gene, we mobilized the *P{SUPor-P}mtTFB1^[KG07792]* transposon located in the proximal 5'-region of the gene using standard procedures (34) (FigS1). From approximately 100 independent lines in which the P element had been removed, two lines carrying deletions that map specifically in the *ccdc56* coding sequence without affecting the *mtTFB1* coding sequence, *ccdc56^{D6}* and *ccdc56^{D11}*, were selected (Fig3A-C). A *Drosophila* line harbouring an allele in which the P element was excised precisely without removing additional DNA sequence was used as a control (designated Control 2, Fig3D-E). The control flies were obtained by the same process as those harboring the deletions. Homozygous *ccdc56^{D6/D6}* and *ccdc56^{D11/D11}* flies are not viable and die in the third larval instar stage, suggesting that *ccdc56* is essential for development. *ccdc56^{D6/D11}* trans-heterozygotes showed the same lethal

phenotype as homozygous *ccdc56*^{D6/D6} and *ccdc56*^{D11/D11} flies, indicating that these alleles did not complement each other, which is expected if the molecular lesion affects the same gene. To map precisely the deletion breakpoints, we PCR-amplified and sequenced the genomic region flanking the *P* element (Fig3A-C). The *ccdc56*^{D6} allele harbors a 570 bp-long deletion that includes the ATG-initiation codon and the first 23 nucleotides of the ORF of CCDC56 (Fig3B). The *ccdc56*^{D11} allele shows a larger deletion of 1068 bp, comprising the complete *ccdc56* coding sequence and the first 26 nucleotides of the intron in the *ccdc56-mtTFB1* mRNA (Fig 3C).

Phenotype of *ccdc56*^{D6/D6} and *ccdc56*^{D11/D11} *Drosophila* fly lines

Heterozygous *ccdc56*^{D6}/TM6B-Tb and *ccdc56*^{D11}/TM6B-Tb flies are viable and fertile, and can be distinguished easily by the genetic marker *Tubby* (Tb, generating small pupa size) that allows classifying the progeny. When raised at 25°C, heterozygous mutant larvae, like control larvae, reached the third larval stage at 4-5 days After Egg Laying (AEL). However *ccdc56*^{D6/D6} and *ccdc56*^{D11/D11} homozygotes took between 10-12 days to reach the third larval stage, monitored by analyzing the mouth hook morphology (Fig4B), indicating a developmental delay (see FigS2). Homozygous *ccdc56*^{D6/D6} and *ccdc56*^{D11/D11} third instar larvae were much smaller than controls, remained in this stage for over 20 days and then died before pupariation (Fig4A and FigS2). We used the *ccdc56*^{D11/D11} mutant to perform immunocytochemical analysis in wing imaginal discs, the proliferating larval epithelial cells that form the adult wings of the fly. Mutant imaginal discs were smaller than controls. Indeed, mutant wing discs showed a decreased number of mitotic cells, as seen by a reduction in the number of cells that express phosphorylated Histone 3, a mitotic cell marker (Fig4C). *ccdc56*^{D11/D11} mutants also showed increased levels of apoptosis in the wing discs as detected with an antibody that recognizes activated Caspase3, whereas cell death in control wing discs was minimal during most of the larval development (Fig4D). These results indicate that two of the processes that contribute to tissue growth, cell division and cell survival, are compromised in the *ccdc56*^{D11/D11} mutant.

The phenotype of *ccdc56*^{D6/D6} and *ccdc56*^{D11/D11} *Drosophila* lines is produced by the absence of CCDC56.

Because both deletions remove a large 5'-region upstream of the *ccdc56/mtTFB1* genes that potentially contain critical promoter elements involved in regulating their transcription, we used RT-PCR to identify truncated transcripts encoding the *mtTFB1* gene in the mutant lines. Interestingly, in both the homozygous D6 and D11 lines the levels of truncated *ccdc56/mtTFB1* transcript ranged between 20-30% as compared to the wild type controls (Fig3E). Detailed analysis using 5'-RACE revealed the presence of a family of transcripts originating from the 5'-upstream region close to the breakpoints (Fig3B-C), indicating clearly that these regions still contain promoter activity. All the detected transcripts expressed in the mutant lines contained the complete *d-mtTFB1* coding sequence (Fig3B-C) but as expected, they lacked the complete *ccdc56* coding sequence. Accordingly, no CCDC56 was detected by immunoblot analysis of mitochondrial extracts from *ccdc56*^{D6/D6} and *ccdc56*^{D11/D11} larvae, indicating that both are *ccdc56* null alleles (Fig3F); in contrast, mtTFB1 is present in mitochondrial extracts prepared from the mutant larvae (Fig3F).

To demonstrate further that the lethal phenotype observed in the mutants isolated in our screen was due exclusively to the loss of CCDC56 function, we overexpressed independently *ccdc56* or *mtTFB1* in both D6 and D11 homozygous genetic backgrounds. We cloned the *ccdc56* and *mtTFB1* coding sequences in the *pUASP* vector and generated several UAS-CCDC56 and UAS-mtTFB1 transgenic lines (See Materials and Methods). We selected two independent lines for each transgene that were viable upon homozygosis, and we generated stable stocks carrying these UAS constructs in homozygosis on chromosome II, and the *ccdc56*^{D6} or *ccdc56*^{D11} alleles balanced over the TM6B-Tb chromosome on chromosome III (See FigS3A-B). To direct the expression of the transgenic UAS constructs we used the ubiquitous arm-GAL4 driver, in which expression of the transcription activator factor GAL4 is driven by the *armadillo* promoter (β-catenin homolog in mammals; FigS3C). We found that homozygous mutant larvae carrying one copy

each of the UAS-CCDC56 and the arm-GAL4 transgenes developed beyond the third larval stage, reaching the pupal stage (Fig5A). Two independent transgenic lines expressing CCDC56 produced $62.8 \pm 1.8\%$ and $55.9 \pm 4.8\%$ of the homozygous mutant pupae progeny expected for a neutral allele (Table 1). However, the UAS-mtTFB1 construct directed by the same driver was not able to rescue lethality at the third larval stage for mutants carrying the *D6* or *D11* deletion allele (to simplify, only data are shown regarding the *ccdc56^{D11}* allele, Table 1 and Fig5A). The presence in a mutant background of a copy only of the arm-GAL4 driver or a copy only of the UAS-CCDC56 construct did not rescue mutant lethality. Accordingly, all pupae scored in the vials were heterozygous for the mutant allele (Table 1 and Fig5A).

Quantification of transcript levels by qRT-PCR in homozygous third instar larvae of the different genotypes showed that the arm-GAL4 driver restores *ccdc56* mRNA levels to $73.9\% \pm 0.1$ of controls in a *D11* mutant background (Fig5B, white bar). Despite this increase in mRNA levels, CCDC56 protein measured by immunoblot analysis was increased only to 15% of control levels (Fig5C). This result indicates that the induction of low levels of CCDC56 is sufficient to rescue the developmental arrest of the *ccdc56^{D11/D11}* mutant, permitting pupation of the larvae and most of the metamorphosis program of the flies (Fig5A). The fact that the rescue of lethality was not complete may be explained by the slight increase of the CCDC56 protein obtained under these conditions. Accordingly, by restoring CCDC56 to control levels (by inducing the expression of the bicistron), we obtained a stronger rescue of lethality: $96.77\% \pm 1.6$ of the *ccdc56^{D11/D11}* mutant progeny reached the pupal stage and $34.5\% \pm 4.5$ reached the adult stage (FigS4). As expected, the transcript levels assessed with the probe that recognizes the bicistronic mRNA were nearly absent in the *D11* homozygous larvae for all transgene combinations, as the *D11* deletion (shown in Fig3C) includes part of the recognition sequence for this probe (Fig5B, grey bars; Fig3E probe1).

***ccdc56* knockout flies show a severe isolated cytochrome *c* oxidase deficiency.**

To study the effect of the absence of CCDC56 on mitochondrial function we measured the OXPHOS enzyme activities in control and homozygous mutant third instar larvae. Both *ccdc56^{D11/D11}* and *ccdc56^{D6/D6}* mutant larvae showed a dramatic reduction in cytochrome *c* oxidase (COX, complex IV, CIV) activity (Fig6A). The decrease in COX activity was almost complete when activities were normalized with respect to citrate synthase activity, an indicator of total mitochondrial mass (data not shown). This decrease in COX activity in *ccdc56^{D11/D11}* mutant larvae was confirmed by Blue Native PAGE in combination with *in-gel* activity assays (IGAs, Fig6B). Interestingly, the enzyme activities of the remaining OXPHOS complexes were either unaffected or increased significantly (complexes I and II in *ccdc56^{D11/D11}* mutants, Fig6A), a result that may reflect a compensatory response to the dramatic reduction of COX activity in the mutants. Accordingly, complex I activity of the mutants was increased in the native gels (Fig6B). Most interestingly, a huge increase (4-5 fold) in mtDNA levels was also observed in mutant mitochondria as compared to controls (Fig6C). In addition, a moderate increase was observed in the steady-state levels of mitochondrial RNA (mtRNA) transcripts (Fig6D), including the small ribosomal RNA (rRNA-12S) and the cytochrome *c* oxidase transcripts *mt-CO1*, *mt-CO2* and *mt-CO3* that are increased 2-to-2.5-fold (Fig6D). The increased mtRNA transcript levels in both mutants were confirmed by Northern-blot analyses (data not shown).

The ubiquitous expression of the UAS-CCDC56 construct in a *ccdc56^{D11/D11}* genetic background induced a significant increase in COX enzyme activity ($37.4\% \pm 0.043$ vs $19.5\% \pm 0.040$; Fig7C). As expected, expression of the UAS-mtTFB1 construct under the same conditions had no effect, showing similar levels of COX activity as the mutants ($14.3\% \pm 0.043$ Fig7C). These results suggest strongly that CCDC56 is required for cytochrome *c* oxidase function in *Drosophila melanogaster*.

***ccdc56* knockout flies show a severe reduction of fully-assembled complex IV**

Because the only OXPHOS complex affected in *ccdc56* knockout flies is complex

IV, we next explored by Blue Native-PAGE analysis if the assembly of this complex was affected in the mutants. Several antibodies against mammalian mitochondrial and nuclear-encoded COX subunits were tested against *Drosophila* protein extracts, but unfortunately most showed little or no cross reactivity (data not shown). To determine the levels of fully-assembled complex IV in our mutant flies we performed 2D Blue Native PAGE followed by immunoblot analysis with an anti-mt-CO3 antibody that was able to recognize *Drosophila* mt-CO3. In *ccdc56^{D11/D11}* and *ccdc56^{D6/D6}* mitochondria, we observed a dramatic decrease in the levels of fully-assembled holo-COX (indicated by complex S4, Fig7A). However, we did not detect the accumulation of any subcomplex or putative assembly intermediate in our mutants, at least under the conditions tested (Fig7A). To demonstrate that the absence of CCDC56 function was responsible for the mutant CIV assembly defect, we attempted to rescue this phenotype by inducing the ubiquitous expression of a *UAS-CCDC56* transgene in a mutant background. Consistent with our hypothesis, we observed a recovery of fully-assembled complex IV levels in mutants expressing *UAS-CCDC56* (Fig7A, third panel), but not when we overexpressed mitochondrial translation factor B1 (Fig7A, fourth panel). This result indicates that CCDC56 is required for the proper assembly and/ or stability of mitochondrial complex IV in *Drosophila melanogaster*.

DISCUSSION

We have identified in *D. melanogaster* a novel mitochondrial protein, CCDC56, which is evolutionarily well conserved in metazoans. CCDC56 belongs to the Coiled-Coil Domain Containing family of proteins and although its function is unknown, we found that loss of CCDC56 results in a severe isolated enzyme deficiency and assembly defect of mitochondrial cytochrome *c* oxidase. This indicates that CCDC56 plays a critical role in the biogenesis and activity of complex IV, and is therefore essential for the function of the OXPHOS system.

In *D. melanogaster*, CCDC56 is annotated in a single transcription unit together with mitochondrial transcription factor B1 (Flybase, <http://www.flybase.org>). Blast

analyses showed that this organization is also present in the other 11 *Drosophila* species for which sequence data is available (data not shown). Northern blot and RACE experiments demonstrate that *ccdc56* and *mtTFB1* are encoded on the same functional bicistronic transcript in *D. melanogaster*. Although the presence of operon-like structures is not frequent in eukaryotes, a comparative evolutionary study of 12 *Drosophila* genomes predicted the presence of 123 novel polycistronic transcripts (41). More recently, another comparative genomic approach using *D. melanogaster* and *Anopheles gambiae* transcript annotations and dipteran expressed sequence tags was performed in order to identify transcripts with upstream Open Reading Frames (uORFs). Interestingly, in dipterans conserved uORFs occur preferentially in transcripts encoding mitochondrial proteins and methyltransferases (42). The uORF usually encodes smaller proteins than those encoded in the main ORF (mORF). Some examples in *Drosophila* are the translocase of the inner membrane 10, Tim 10 (Flybase annotation: CG9878), and the translocase of the inner membrane 9b, Tim 9b (CG17767). It is possible that at least some of these uORFs are vestiges of ancient prokaryotic operons that originated in the mitochondrion and were transferred to the nuclear genome over time. Another possible explanation would be that these structural organizations favor a coordinated regulation of genes involved in similar biochemical pathways (23).

We further investigated if this novel peptide is targeted to the mitochondrial compartment, like mtTFB1, by transfecting HeLa cells with a recombinant d-CCDC56FLAG-tagged protein. We observed a clear mitochondrial localization of CCDC56, and in addition we detected by immunoblotting the endogenous CCDC56 only in the mitochondrial fraction. Therefore, and in agreement with the results obtained in the comparative genomic study, we describe here a new case of a bicistronic transcript in which both proteins have a mitochondrial function. To our knowledge, this is the first demonstration of a eukaryotic bicistron in which both proteins have a mitochondrial function that is demonstrated to be functional *in vivo*.

We explored the consequences of the lack of function of mitochondrial protein CCDC56 by generating two independent *Drosophila* knockout lines via inducing the excision of a P element located in the promoter region of the *ccdc56-mtTFB1* genes. Its imprecise excision removed part of the flanking DNA and therefore generated specific deletions. Transcripts detected by RACE in the *ccdc56^{D6}* knockout line lack the first 23 nucleotides and therefore the translation start codon of *ccdc56*, while no *ccdc56* containing transcripts were detected in the *ccdc56^{D11}* knockout line. As expected, CCDC56 was not detected in mitochondrial extracts from any of the mutant lines, indicating a total absence of CCDC56 protein in homozygous *ccdc56^{D6}* and *ccdc56^{D11}* animals. Furthermore, we have demonstrated that both mutant lines retained *mtTFB1*-encoding transcripts and mtTFB1 protein, although in lower levels as compared to controls. Finally, we used the UAS-GAL4 system (43) to promote independent expression of CCDC56 or mtTFB1 in a mutant background. Overexpression of CCDC56 but not mtTFB1 rescued all mutant phenotypes: developmental delay, larval lethality, decreased complex IV enzyme activity and reduction in the levels of fully-assembled complex IV. Previous results have shown that mtTFB1 is essential for mitochondrial translation and more specifically for the stability of the small subunit of the mitochondrial ribosomes (12S rRNA) (32,33). Thus, if the functionality of mtTFB1 were affected in these alleles, we would expect a broader mitochondrial phenotype, not simply an isolated complex IV deficiency. Biochemical measurements and *in-gel* activity assays showed no decrease in the other respiratory chain complex activities in mutant animals, nor in complex V levels detected by Blue Native PAGE, which were even higher in the mutants. Taken together, our results indicate clearly that the phenotypes exhibited by the mutants were due exclusively to loss of CCDC56 function.

The main biochemical phenotype of the lack of CCDC56 is a severe isolated complex IV deficiency, suggesting a role for CCDC56 in complex IV activity and consequently in the proper function of the OXPHOS system. Interestingly, in *ccdc56* knockout animals the OXPHOS defect elicits a compensatory response that causes a

significant increase in mtDNA, in mitochondrial transcript levels, in OXPHOS activities in complexes I and II, and in levels of fully-assembled complex V. The molecular nature of this retrograde signaling is presently unknown.

The OXPHOS defect caused by the CIV deficiency may be responsible for the developmental delay and 100% lethality in the third larval instar observed in *ccdc56* knockout individuals. Mutant wing discs showed a reduced size, a decrease in cell proliferation and an increase in apoptosis levels as compared to controls. Larval to adult metamorphosis, which occurs during the pupal phase, is a high-energy requiring process. Thus, defects in the OXPHOS system, and consequently defects in ATP production, may be critical for successful completion of this developmental phase. This is supported by the phenotype observed in several other *Drosophila* mitochondrial gene mutants. For example, knockdown of *mtTFB2*, which encodes the mitochondrial transcription factor B2, or mutations in mitochondrial single-stranded DNA-binding protein, both involved in mtDNA replication, also cause a developmental delay and a developmental arrest in the third larval instar (44;45).

Complex IV assembly was studied initially by Nijtmans and colleagues (46), and subsequently by others (47) using Blue Native gel electrophoresis in human cell lines or tissues from patients with genetic defects in assembly factors (reviewed in (7) and (48)). These studies describe complex IV biogenesis as a sequential process involving four intermediates, S1 to S4. The process starts with the incorporation of the prosthetic groups into mt-COI to form the subassembly intermediate S1. The last intermediate, S4 or holo-COX, constitutes the monomeric form of COX that subsequently dimerizes to form the active complex (46). Fully-assembled holo-COX levels were decreased greatly in homozygous *ccdc56^{D11}* knockout larvae, as assessed by 2D Blue Native electrophoresis using an anti-mt-CO3 antibody. As expected, fully-assembled complex IV levels were restored partially by the ubiquitous expression of a UAS-*ccdc56* transgene in the mutant background. These results indicate that CCDC56 is essential for the formation or stabilization of complex IV. No subassembly intermediates were detected under these

conditions, mt-CO3 is incorporated into the S3 intermediate, as indicated by the absence of fully-assembled holo-COX and the accumulation of S1 and S2 in cultured fibroblasts from patients lacking mt-CO3 (49), and reviewed in (50) and (48). Unfortunately, we tried several antibodies against other complex IV subunits with no success, so we cannot rule out the possible accumulation of other subassembly intermediates not containing mt-CO3 and thus, a role for CCDC56 in the early steps of complex IV biogenesis.

Although the function of CCDC56 in flies remains unknown, because *ccdc56* knockout strains have extremely low levels of fully assembled complex IV it is tempting to suggest that CCDC56 constitutes a new complex IV assembly factor. In this regard, CCDC56 might participate in various steps of complex IV biogenesis: synthesis of mitochondrial COX subunits, synthesis of COX cofactors, the stability of different COX subunits or their assembly into a functional holoenzyme. We suggest that it may function as a translational activator similar to TACO1 (20), or as a membrane insertion factor like OXA1 (51). Future experiments are warranted

to explore these possibilities. Notably, increasing number of essential assembly factors for the biogenesis of a functional cytochrome *c* oxidase have been identified in *S. cerevisiae* (10). We found by Blast analysis that CCDC56 homologues are present in metazoans that show high conservation levels. However, no CCDC56 homologue was detected in yeast. The absence of a CCDC56 homologue in yeast might be due to a low evolutionary conservation or could suggest the presence of novel levels of regulation of the complex IV assembly process in metazoans, thus highlighting the importance of using different model systems for the identification of the complete mitochondrial proteome.

In conclusion, we have identified CCDC56 as a novel mitochondrial protein essential for cytochrome *c* oxidase activity in *D. melanogaster* and hence OXPHOS function. The high degree of conservation between the human and *Drosophila* proteins suggests strongly that the biological function of CCDC56 has been preserved in metazoans, making CCDC56 a new candidate gene to study in human mitochondrial diseases involving isolated cytochrome *c* oxidase deficiency.

REFERENCES

1. Wallace, D. C., Fan, W., and Procaccio, V. (2010) *Annu Rev Pathol* **5**, 297-348
2. DiMauro, S., and Hirano, M. (2005) *Neuromuscul Disord* **15**, 276-286
3. Zeviani, M., and Carelli, V. (2007) *Curr Opin Neurol* **20**, 564-571
4. DiMauro, S., and Schon, E. A. (2003) *N Engl J Med* **348**, 2656-2668
5. Schaefer, A. M., McFarland, R., Blakely, E. L., He, L., Whittaker, R. G., Taylor, R. W., Chinnery, P. F., and Turnbull, D. M. (2008) *Ann Neurol* **63**, 35-39
6. Shoubridge, E. A. (2001) *Am J Med Genet* **106**, 46-52
7. Diaz, F. (2010) *Biochim Biophys Acta* **1802**, 100-110
8. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-1074
9. Szuplewski, S., and Terracol, R. (2001) *Genetics* **158**, 1629-1643
10. Fontanesi, F., Soto, I. C., and Barrientos, A. (2008) *IUBMB Life* **60**, 557-568
11. Galati, D., Srinivasan, S., Raza, H., Prabhu, S. K., Hardy, M., Chandran, K., Lopez, M., Kalyanaraman, B., and Avadhani, N. G. (2009) *Biochem J* **420**, 439-449
12. Arnold, S., and Kadenbach, B. (1997) *Eur J Biochem* **249**, 350-354
13. Kadenbach, B., Huttemann, M., Arnold, S., Lee, I., and Bender, E. (2000) *Free Radic Biol Med* **29**, 211-221
14. Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., Ferrero, I., Mereghetti, P., D'Adamo, P., Gasparini, P., and Zeviani, M. (2008) *Am J Hum Genet* **82**, 1281-1289
15. Barrientos, A., Gouget, K., Horn, D., Soto, I. C., and Fontanesi, F. (2009) *Biochim Biophys Acta* **1793**, 97-107
16. Papadopoulou, L. C., Sue, C. M., Davidson, M. M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J. E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D. M., Coster, R. V., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De Vivo, D. C., Bonilla, E., Hirano, M., DiMauro, S., and Schon, E. A. (1999) *Nat Genet* **23**, 333-337
17. Valnot, I., von Kleist-Retzow, J. C., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Taanman, J. W., Mehaye, B., Rustin, P., Tzagoloff, A., Munnich, A., and Rotig, A. (2000) *Hum Mol Genet* **9**, 1245-1249
18. Antonicka, H., Mattman, A., Carlson, C. G., Glerum, D. M., Hoffbuhr, K. C., Leary, S. C., Kennaway, N. G., and Shoubridge, E. A. (2003) *Am J Hum Genet* **72**, 101-114
19. Stiburek, L., Vesela, K., Hansikova, H., Hulkova, H., and Zeman, J. (2009) *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C1218-1226
20. Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J. E., Lochmuller, H., Chevrette, M., Kaufman, B. A., Horvath, R., and Shoubridge, E. A. (2009) *Nat Genet* **41**, 833-837
21. Xu, F., Addis, J. B., Cameron, J. M., and Robinson, B. H. (2011) *Biochem J*
22. Xu, F., Morin, C., Mitchell, G., Ackerley, C., and Robinson, B. H. (2004) *Biochem J* **382**, 331-336
23. Blumenthal, T. (2004) *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**, 199-211
24. Andrews, J., Smith, M., Merakovsky, J., Coulson, M., Hannan, F., and Kelly, L. E. (1996) *Genetics* **143**, 1699-1711
25. Brogna, S., and Ashburner, M. (1997) *EMBO J* **16**, 2023-2031
26. Betran, E., and Ashburner, M. (2000) *Mol Biol Evol* **17**, 1344-1352
27. Estes, P. S., Jackson, T. C., Stimson, D. T., Sanyal, S., Kelly, L. E., and Ramaswami, M. (2003) *Genetics* **165**, 185-196
28. Scarpulla, R. C. (2008) *Physiol Rev* **88**, 611-638
29. Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G., and Gustafsson, C. M. (2002) *Nat Genet* **31**, 289-294
30. Seidel-Rogol, B. L., McCulloch, V., and Shadel, G. S. (2003) *Nat Genet* **33**, 23-24

31. Cotney, J., and Shadel, G. S. (2006) *J Mol Evol* **63**, 707-717
32. Matsushima, Y., Adan, C., Garesse, R., and Kaguni, L. S. (2005) *J Biol Chem* **280**, 16815-16820
33. Metodiev, M. D., Lesko, N., Park, C. B., Camara, Y., Shi, Y., Wibom, R., Hultenby, K., Gustafsson, C. M., and Larsson, N. G. (2009) *Cell Metab* **9**, 386-397
34. Engels, W. R., Johnson-Schlitz, D. M., Eggleston, W. B., and Sved, J. (1990) *Cell* **62**, 515-525
35. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402
36. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680
37. Perez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martin, M. A., Rubio, J. C., Martin, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J., and Solis-Herruzo, J. A. (2003) *Hepatology* **38**, 999-1007
38. Calvaruso, M. A., Smeitink, J., and Nijtmans, L. (2008) *Methods* **46**, 281-287
39. Pena, P., and Garesse, R. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **195**, 785-791
40. Overbeek, R., Fonstein, M., D'Souza, M., Pusch, G. D., and Maltsev, N. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2896-2901
41. Stark, A., Lin, M. F., Kheradpour, P., Pedersen, J. S., Parts, L., Carlson, J. W., Crosby, M. A., Rasmussen, M. D., Roy, S., Deoras, A. N., Ruby, J. G., Brennecke, J., Hodges, E., Hinrichs, A. S., Caspi, A., Paten, B., Park, S. W., Han, M. V., Maeder, M. L., Polansky, B. J., Robson, B. E., Aerts, S., van Helden, J., Hassan, B., Gilbert, D. G., Eastman, D. A., Rice, M., Weir, M., Hahn, M. W., Park, Y., Dewey, C. N., Pachter, L., Kent, W. J., Haussler, D., Lai, E. C., Bartel, D. P., Hannon, G. J., Kaufman, T. C., Eisen, M. B., Clark, A. G., Smith, D., Celniker, S. E., Gelbart, W. M., and Kellis, M. (2007) *Nature* **450**, 219-232
42. Hayden, C. A., and Bosco, G. (2008) *BMC Genomics* **9**, 61
43. Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993) *Development* **118**, 401-415
44. Adan, C., Matsushima, Y., Hernandez-Sierra, R., Marco-Ferreres, R., Fernandez-Moreno, M. A., Gonzalez-Vioque, E., Calleja, M., Aragon, J. J., Kaguni, L. S., and Garesse, R. (2008) *J Biol Chem* **283**, 12333-12342
45. Maier, D., Farr, C. L., Poeck, B., Alahari, A., Vogel, M., Fischer, S., Kaguni, L. S., and Schneuwly, S. (2001) *Mol Biol Cell* **12**, 821-830
46. Nijtmans, L. G., Taanman, J. W., Muijsers, A. O., Speijer, D., and Van den Bogert, C. (1998) *Eur J Biochem* **254**, 389-394
47. Fornuskova, D., Stiburek, L., Wenchich, L., Vinsova, K., Hansikova, H., and Zeman, J. (2010) *Biochem J* **428**, 363-374
48. Fernandez-Vizarra, E., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2009) *Biochim Biophys Acta* **1793**, 200-211
49. Tiranti, V., Corona, P., Greco, M., Taanman, J. W., Carrara, F., Lamantea, E., Nijtmans, L., Uziel, G., and Zeviani, M. (2000) *Hum Mol Genet* **9**, 2733-2742
50. Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2006) *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C1129-1147
51. Bonnefoy, N., Fiumera, H. L., Dujardin, G., and Fox, T. D. (2009) *Biochim Biophys Acta* **1793**, 60-70

ACKNOWLEDEMENTS

We thank Verónica Domingo for her excellent technical assistance and Dr. Francisca Diaz for critical reading of the manuscript.

FOOTNOTES

This work was supported by grants from the Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (grants PI 07/0167 and PI 10/0703 to R.G.), the Comunidad de Madrid (grant number GEN-0269/2006 to R.G.), ISCIII-Agencia Laín Entralgo (grant number PI08/0021

to C. U.) and from the National Institutes of Health (grant GM45295 to L.S.K.). S.P. was a postdoctoral fellow from CIBERER.

FIGURE LEGENDS

Fig1. The protein CCDC56, encoded in a bicistronic transcript together with mt-TFB1 in *D. melanogaster*, is conserved in metazoans.

A) Genomic map of *CG42630/ccdc56* and *mtTFB1*. Exons are indicated by boxes, coding regions are colored black for the CCDC56 and mtTFB1 proteins, and untranslated regions are represented in white. B) Bicistronic transcript determined by 5'-RACE from control flies (*w¹¹¹⁸* and *OregonR-C*) and cultured Schneider cell cDNAs. The transcription start points identified are depicted as (+1). The primers R1, R2 and R3 used are represented in A. C) Bicistronic *ccdc56*-mtTFB1 mRNA detected by Northern blot using 5 μ g of RNA from *w¹¹¹⁸* (C1) and *OregonR-C* (C2) control larvae. The signal detected using a specific *ccdc56* probe has the same migration as the signal detected when using a probe specific for mtTFB1. D) ClustalW alignment of *Drosophila* CCDC56 protein with CCDC56 sequences from other metazoan species. Accession numbers are as follows: fly (*D. melanogaster*)-CG42630-PA; zebrafish (*Danio rerio*)-A8kB87; western clawed frog (*Xenopus tropicalis*)-A9UM10-1; mouse (*Mus musculus*)-NP_080894.1; cow (*Bos taurus*)-Q3T0E3; human (*Homo sapiens*)-NP_001035521.1. Identical residues in all sequences (*), conserved substitutions (:), and semi-conserved substitutions (.) are noted in the alignment. E) Schematic diagram of the sequences of the human and *Drosophila melanogaster* CCDC56 proteins, showing the putative transmembrane and protein-protein interaction coiled-coil domains.

Fig2. CCDC56 protein localizes to mitochondria.

Immunocytochemistry of HeLa cells transfected with recombinant *d*-CCDC56-FLAG. A) MitoTracker staining is shown in red. B) The same cells immunostained for the FLAG epitope (green). The recombinant *Drosophila* protein colocalizes with the MitoTracker dye in the mitochondrial compartment (C). D) Immunoblots of protein extracts (50 μ g) from subcellular fractions of control embryos, probed with anti-*Drosophila*-CCDC56 (*d*-CCDC56), anti-porin and anti-GAPDH antibodies. Total extracts, mitochondrial fraction (Mit) and post-mitochondrial supernatant (PMS) are shown.

Fig3. Molecular characterization of the *ccdc56^{D6}* and *ccdc56^{D11}* alleles.

A) Genomic map of the *ccdc56* and *mtTFB1* genes showing the P element insertion (SUPor-P^[kg07792]; triangle). Exons are indicated by boxes, coding regions are colored black for the CCDC56 and mtTFB1 proteins, and untranslated regions are represented in white. 5'-RACE from control (*w¹¹¹⁸*) and mutant (*ccdc56^{D6}* and *ccdc56^{D11}*) homozygous third instar larvae cDNAs identified the transcription start points depicted as (+1). The break points of the deletions generated in this work for the alleles *ccdc56^{D6}* and *ccdc56^{D11}* are shown in B) and C), respectively. The ratios of the mRNA as determined by 5'-RACE in the clones analyzed are represented (*ccdc56^{D6/D6}*, n=8; *ccdc56^{D11/D11}*, n=10). PCR products amplified with F5 and R4 primers (shown in A and Table S2) from genomic DNA of third instar larvae are shown in D. Lane 1: DNA from the stock containing the *P-element* SUPor-P^[kg07792], as a negative control. Lane 2: DNA from *w¹¹¹⁸* control flies. Lane 3: DNA from excised flies without any deletion, used as an additional control. Lane 4: DNA from excised flies of the *ccdc56^{D6/D6}* strain, showing a 570 bp deletion. Lane 5: DNA from excised flies of the *ccdc56^{D11/D11}* strain, showing a 1168 bp deletion. E) Transcript levels determined by qRT-PCR in third instar larvae of control and deleted homozygous lines after normalizing to *w¹¹¹⁸* flies using 18S rRNA as an internal control. The two different Taqman probes used are depicted in B. Control 1: *w¹¹¹⁸* flies. Control 2: excised flies without any deletion. F) CCDC56 and mtTFB1 protein levels determined by immunoblotting of mitochondrial extracts (30 μ g) of control and deleted homozygous larvae. Anti VDAC-porin antibody was used as a loading control.

Fig4. Lack of CCDC56 causes arrest at the third larval stage.

A) Size comparison of control (w^{1118}) and homozygous mutant third instar larvae. Homozygous larvae for both alleles were smaller than control larvae in all cases tested. B) Mouth-hook morphology of control third instar larvae and mutant 15 days AEL larvae, indicating third instar. C) Wing imaginal discs from control (w^{1118}) and homozygous $ccdc56^{D11}$ third instar larvae were dissected and immunostained with anti-phosphohistone-3 (PH-3) antibody. Mutant wing discs showed lower cell proliferation levels as compared to controls. D) Anti-caspase-3 activated antibody was used to detect apoptotic signals in wing imaginal discs. Increased apoptotic levels were observed in homozygous $ccdc56^{D11}$ flies as compared to control flies. Bar size is 50 μ m.

Table 1. Rescue analysis of $ccdc56^{D11}/ccdc56^{D11}$ flies.

^a Homozygous $ccdc56^{D11}/ccdc56^{D11}$ pupae scored/ expected *100 of at least three replicate experiments. Homozygous $ccdc56^{D11}/ccdc56^{D11}$ pupae expected are 1/3 of the total progeny of the cross (See FigS4D). The *Tb* marker enables the progeny classes to be distinguished.

Fig5. CCDC56 expression rescues partially the mutant lethality phenotype.

A) Flies homozygous for the $ccdc56^{D11}$ allele reach only the pupal stage when they carry on chromosome II the UAS-CCDC56 and the arm-GAL4 transgenes. Larvae and pupae homozygous for the allele $ccdc56^{D11}$ are of normal size. Larvae and pupae heterozygous for the deletion (genotype $ccdc56^{D11}/TM6B-Tb$) carrying one copy of the *Tb* marker are smaller. B) qRT-PCR of CCDC56, bicistron and mtTFB1 mRNA relative to 18S rRNA, from homozygous $ccdc56^{D11}$ third instar larvae combined with the different UAS-transgenes, and with or without the ubiquitous arm-GAL4 driver. The three Taqman probes used are depicted in the scheme. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent determinations; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *Student's t-test*.

C) Immunoblot of mitochondrial extracts (30 μ g) from homozygous $ccdc56^{D11}$ third instar larvae of the genotypes indicated, incubated with polyclonal anti-mtTFB1 and anti-CCDC56 antibodies, and with monoclonal anti VDAC-porin antibody.

Fig6. $ccdc56$ knockout flies exhibit an isolated complex IV enzyme deficiency.

A) Respiratory chain enzyme activities (complexes I, II, III and IV) and citrate synthase activity were measured in mitochondrial extracts obtained from control and $ccdc56$ knockout third instar larvae of 15 days AEL. Both mutant alleles showed a severe decrease in complex IV enzyme activity. B) BN-PAGE and *in-gel* activity assays of complexes I and IV from mitochondrial extracts (60 μ g) from control and $ccdc56$ knockout third instar larvae. The 880 kDa gel band, corresponding to the ATP synthase (complex V) is shown as a loading control. C) Quantification of relative mtDNA levels by qRT-PCR using ND5 and COXI as mitochondrial gene probes and 18S rRNA as a nuclear gene probe from control, $ccdc56^{D6/D6}$ and $ccdc56^{D11/D11}$ third instar larvae of 15 days AEL. D) Steady-state expression levels of representative genes from polycistronic transcripts from mitochondrial RNA were measured by qRT-PCR from $ccdc56^{D6/D6}$ and $ccdc56^{D11/D11}$ third instar larvae of 15 days AEL, and are shown relative to the levels found in control larvae, after normalization to 18S rRNA levels. Control larvae: genotype w^{1118} ; D6/D6: $ccdc56^{D6/D6}$ and D11/D11: $ccdc56^{D11/D11}$. Data shown in A, C and D represent the mean \pm SEM of at least three independent determinations; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ANOVA.

Fig7. Loss of $ccdc56$ induces a complex IV assembly defect.

A) 2D-BN/ SDS-PAGE analysis of mitochondrial extracts immunoblotted with an antibody against the mitochondrial-encoded subunit mt-CO3 of the cytochrome *c* oxidase complex. Mitochondria-enriched extracts were prepared from third instar larvae of the following genotypes: 1-control w^{1118} , 2-mutant $ccdc56^{D11/D11}$; 3-mutant ubiquitously expressing the UAS-CCDC56 transgene *arm-GAL4/UAS-CCDC56*; $ccdc56^{D11/D11}$; and 4-mutant larvae expressing the UAS-mtTFB1 transgene under the same condition (*arm-GAL4/UAS-mtTFB1*; $ccdc56^{D11/D11}$). The lack of fully-assembled holo-COX exhibited by the $ccdc56^{D11/D11}$ mutant is rescued partially by overexpression of the UAS-CCDC56 transgene. S4, fully assembled

complex IV. The previously identified mt-CO3-containing COX subcomplex S3 is indicated. B) First dimension of a duplicate BN-PAGE of mitochondrial extracts incubated with a polyclonal antibody against complex V as a loading control for the 2D- BN/ SDS-PAGE shown in A. C) Complex IV enzyme activity measured in mitochondrial extracts from homozygous *ccdc56*^{D11/D11} third instar larvae carrying the indicated constructs on chromosome II. Data were normalized to control larvae (*w*¹¹¹⁸) and represent the mean SEM, n=3; *p<0.05; *Student's t-test*.

Figure 1

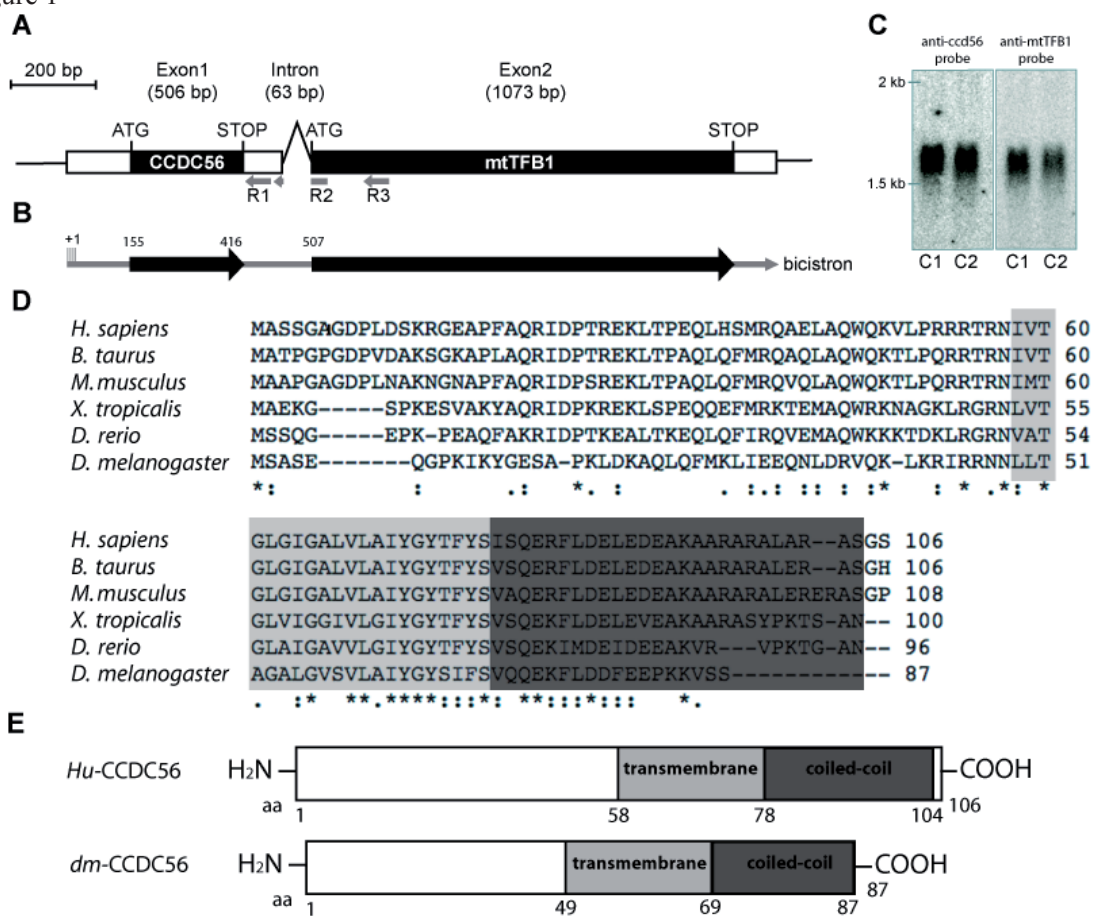


Figure 2

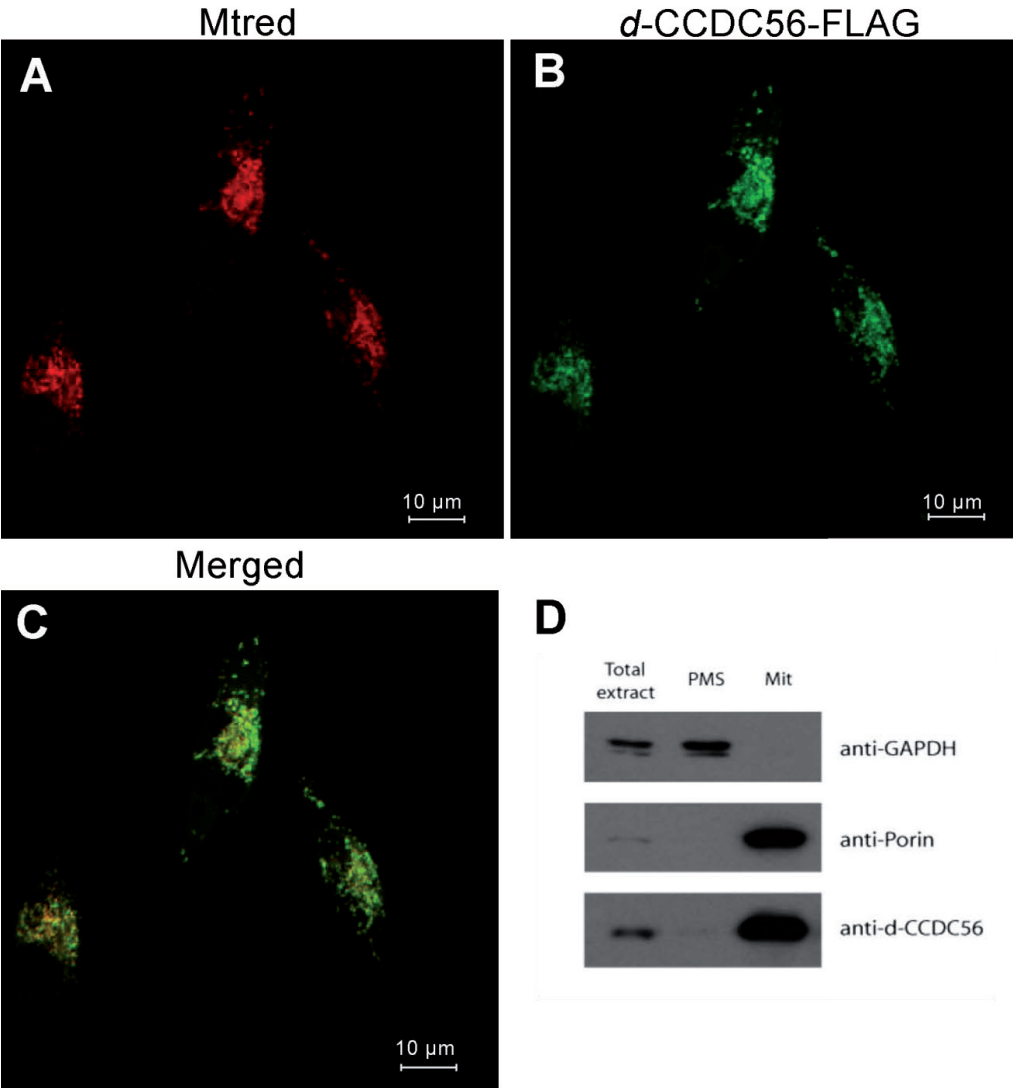


Figure 3

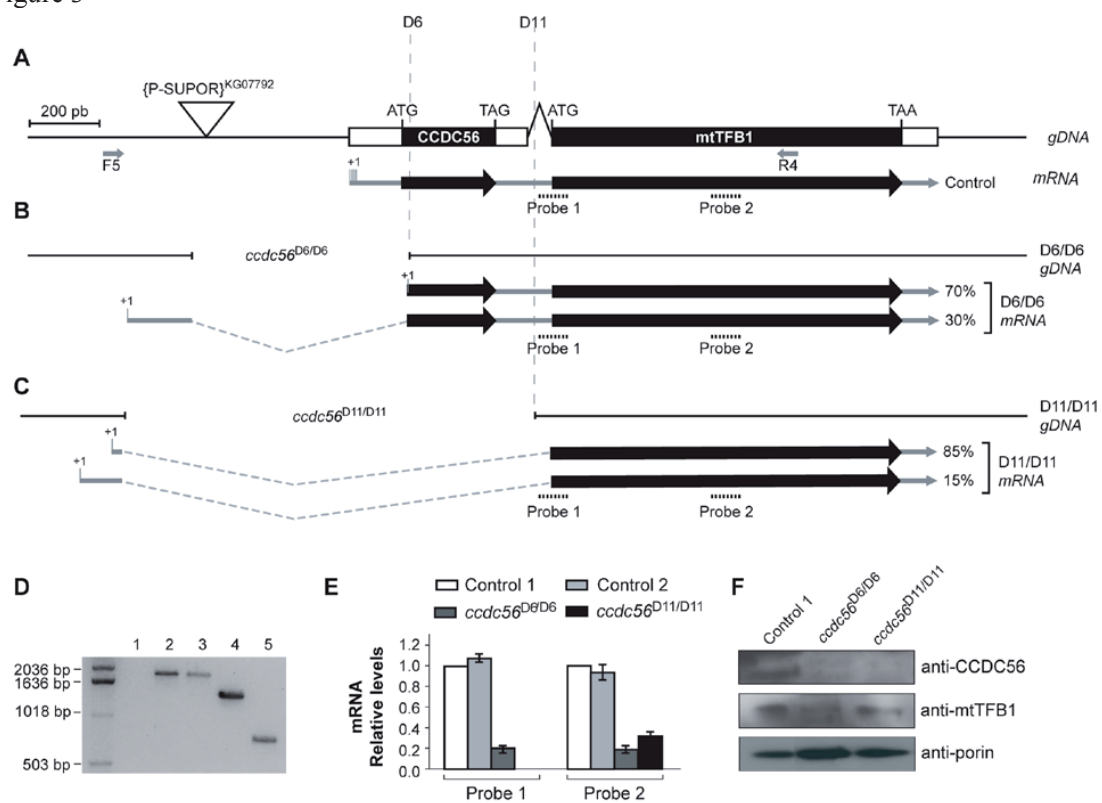


Figure 4

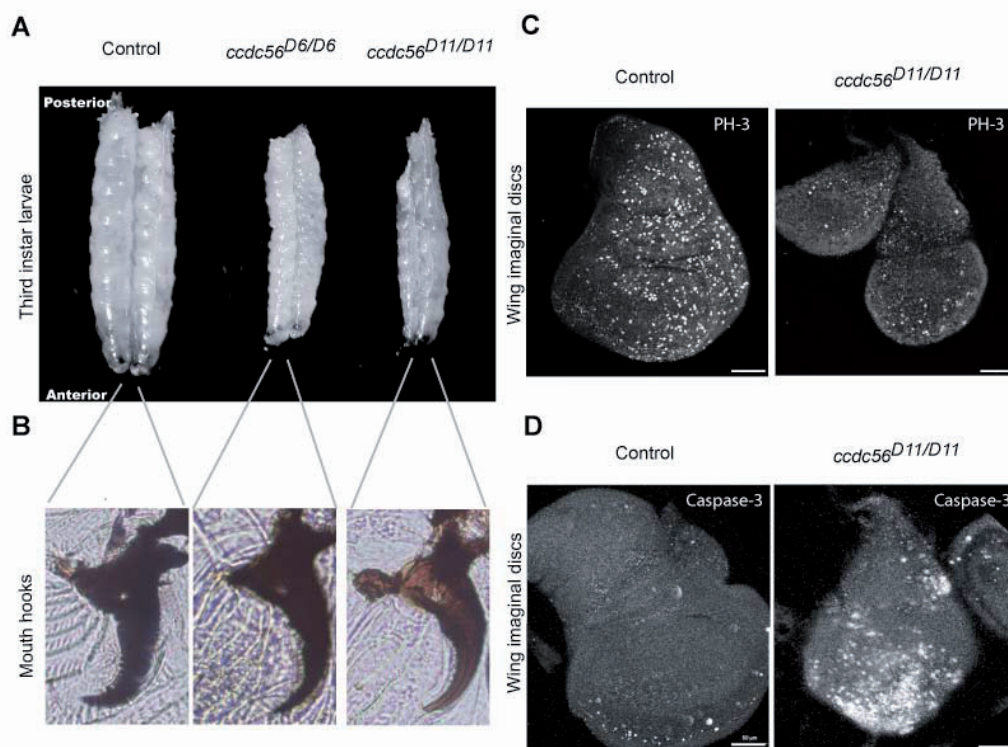


Table 1

TABLE 1
Rescue analysis of *ccdc56*^{D11}/*ccdc56*^{D11} flies

Genotype Chr II	N° of <i>ccdc56</i> ^{D11} /TM6B-Tb pupae scored	N° of <i>ccdc56</i> ^{D11} / <i>ccdc56</i> ^{D11} pupae scored	N° of Total pupae scored	Mean (%) <i>ccdc56</i> ^{D11} / <i>ccdc56</i> ^{D11} pupae scored/expected ^a ± SEM
+/ +	1306	0	1306	0
+/ <i>arm-GAL4</i>	1527	0	1527	0
<i>UAS-CCDC56-1</i> / +	1622	0	1622	0
<i>UAS-CCDC56-1</i> / <i>arm-GAL4</i>	1823	487	2310	62.8 ± 1.8
<i>UAS-CCDC56-2</i> / +	1786	0	1786	0
<i>UAS-CCDC56-2</i> / <i>arm-GAL4</i>	1502	356	1858	55.9 ± 4.8
<i>UAS-mtTFB1-1</i> / +	2039	0	2039	0
<i>UAS-mtTFB1-1</i> / <i>arm-GAL4</i>	1984	0	1984	0
<i>UAS-mtTFB1-2</i> / +	1629	0	1629	0
<i>UAS-mtTFB1-2</i> / <i>arm-GAL4</i>	1626	0	1626	0

Figure 5

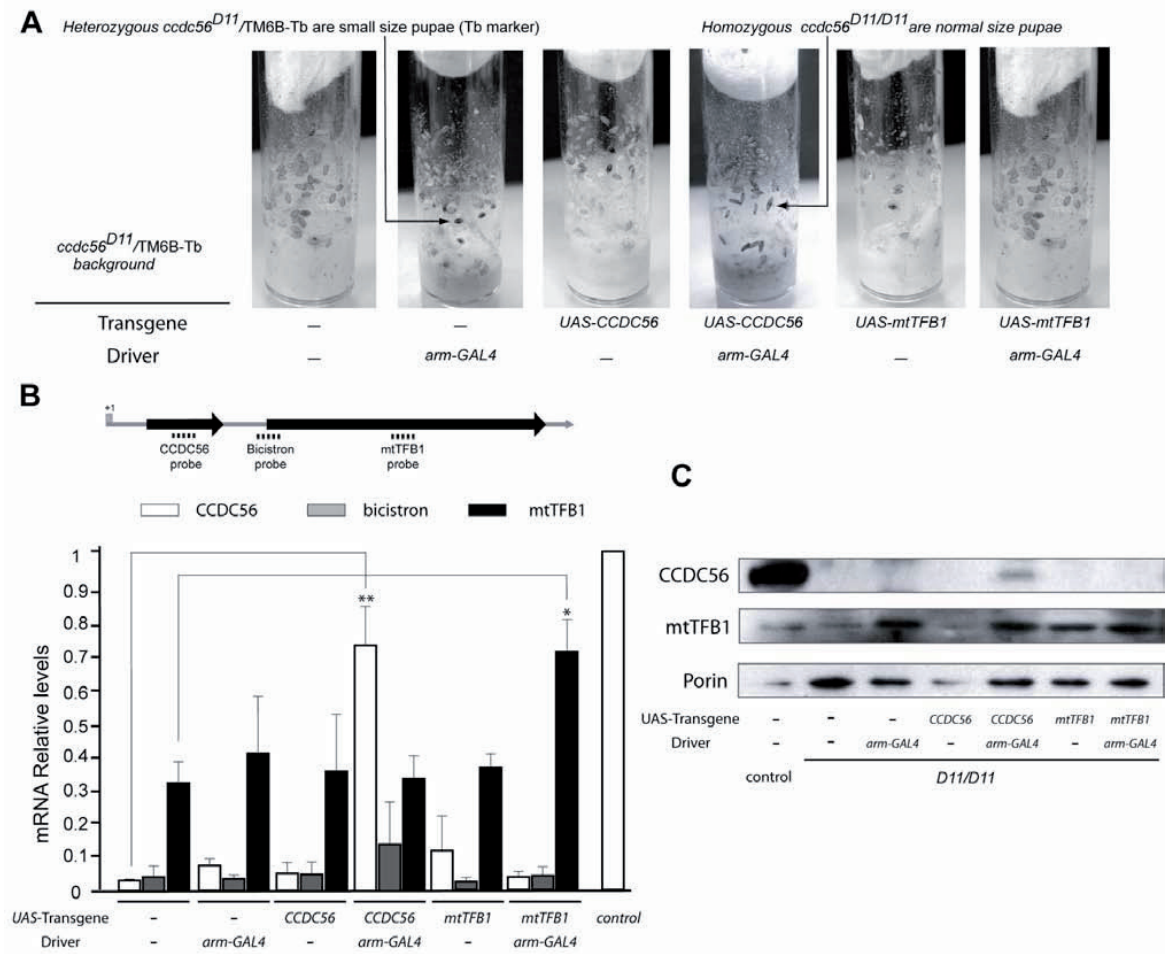


Figure 6

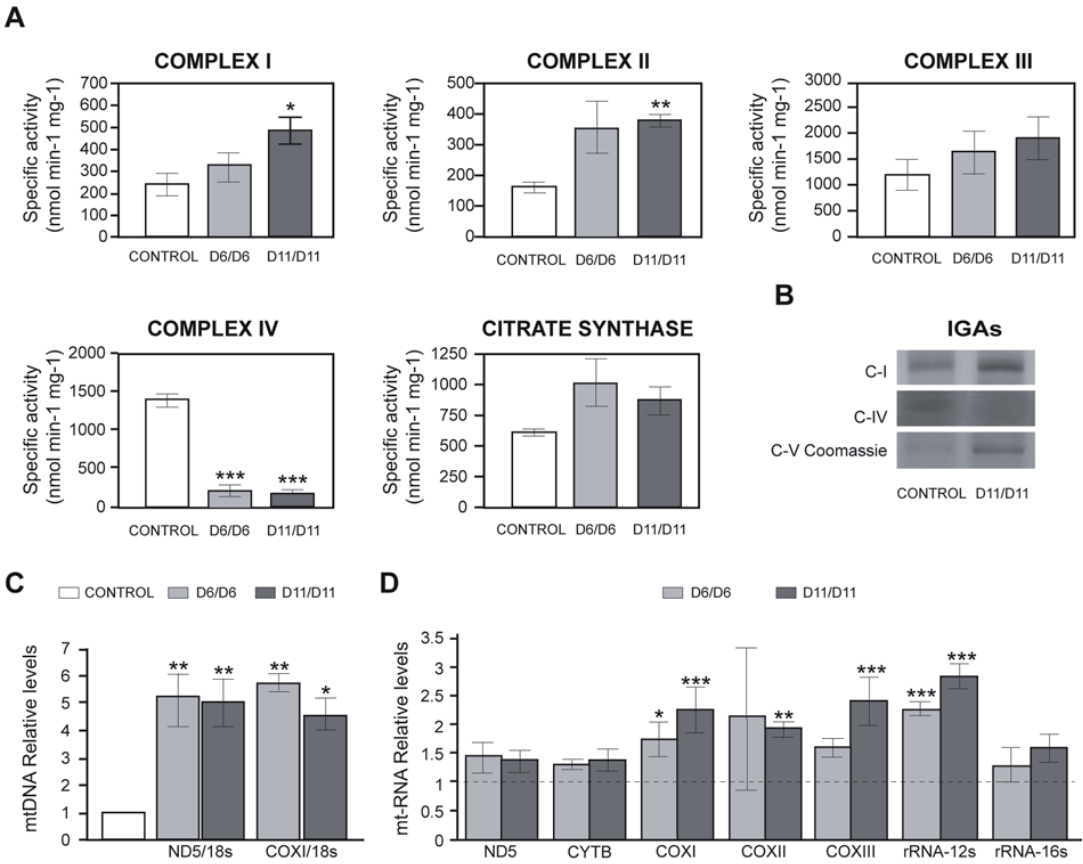


Figure 7

